



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus der Klinik für Kinderchirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Lutz Wünsch

**Entwicklung eines genitalen Dermismodells und dessen erste
Anwendung als experimentelle Versuchsanordnung zum
Nachweis Androgen-responsiver Gene**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

Vorgelegt von
Janina Maren Kalk
aus Berlin

Lübeck 2025

1. Berichterstatter*in: Prof. Dr. med. Lutz Wünsch

Ko-Betreuer*in: Prof. Dr. med. Olaf Hiort

2. Berichterstatter*in: Prof. Dr. med. Felix Stang

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 18.12.2025

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungen	IV
II. Abbildungsverzeichnis	VI
III. Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Genitalhaut.....	2
1.2 Tissue-Engineering.....	3
1.2.1 Tissue Engineering der Haut.....	5
1.2.2 Tissue Engineering des Urogenitaltrakts	7
1.3 DSD-Forschung.....	8
1.3.1 Androgene	8
1.3.2 Die Androgenbiosynthese	9
1.3.3 Struktur und Funktion des Androgenrezeptors.....	11
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	15
1.4.1 Fragestellung.....	15
1.4.2 Zielsetzung	16
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Material	19
2.2 Ethikvotum und Einverständnis.....	19
2.3 Methoden	19
2.3.1 Zellkultur.....	20
2.3.2 MTT-Reduktions-Assay	24
2.3.3 Immunhistologische Färbung	25
2.3.4 Proteinanalyse	27
2.3.5 SDS-PAGE und Westernblot	28
2.3.6 RNA-Analyse	31
2.3.7 Real-Time-PCR	33
2.3.8 Statistische Auswertung	37

3	Ergebnisse	38
3.1	Wachstumsversuche	38
3.2	Vergleich von Integra®-Matrix-Kultur mit Monolayerkultur, beide mit und ohne Zusatz von DHT	40
3.3	Nachweis des Androgenrezeptors	41
3.3.1	Nachweis des Androgenrezeptors mittels immunhistologischer Färbung ..	42
3.3.2	Nachweis des Androgenrezeptorproteins mittels Westernblot	44
3.3.3	Nachweis der Androgenrezeptor-RNA mittels RT-PCR	47
3.4	Nachweis der potenziell Androgen-responsiven Gene mittels RT-PCR und Vergleich zwischen Monolayer- und Integra®-Matrix-Kulturen	49
3.4.1	Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	49
3.4.2	Apolipoprotein D (ApoD)	51
4	Diskussion	54
4.1	Erstellung des genitalen Dermismodells	56
4.2	Klinische Anwendbarkeit	57
4.3	Einfluss der Dreidimensionalität auf die Vorhautfibroblasten	58
4.4	Nutzung als Versuchseinheit in der DSD-Forschung.....	60
4.5	Nachweis Androgen-responsiver Gene	61
4.5.1	Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	62
4.5.2	Apolipoprotein D (ApoD)	64
4.6	Kritische Bewertung und Ausblick	68
5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis	72
7	Anhänge	83
7.1	Material	83
7.1.1	Geräte	83
7.1.2	Software.....	84
7.1.3	Verbrauchsmaterialien	84

7.1.4	Chemikalien und Reagenzien.....	85
7.1.5	Kits	88
7.1.6	Antikörper.....	88
7.1.7	Primer	88
7.1.8	Zellen	89
7.1.9	Selbsthergestellte Reagenzien und Gele	89
8	Ethikvotum	92
9	Danksagungen	94

I. Abkürzungen

ACSM:	azelluläre Corpus spongiosum Matrix
AF1:	activation function 1
AF2:	activation function 2
AIS:	Androgen Insensitivity Syndrome, Androgenresistenz
ApoD:	Apolipoprotein D
APS:	Ammoniumsulfat
AR:	Androgenrezeptor
ARE:	Androgen-responsive Elemente
ATP:	Adenosintriphosphat
bp:	Basenpaare
CAIS:	komplette Androgenresistenz
cDNA:	complementary DNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEA:	Cultured Epidermal Autograft
CSS:	Cultured Skin Substitutes
CTP:	Cytidintriphosphat
DBD:	DNA-Bindungsdomäne
DCC-FCS:	steroidfreies fötales Kälberserum
DEO:	Deoxycholat
DHT:	Dihydrotestosteron
DMEM:	Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DSD:	Disorder/ Difference of Sex Development
DTT:	Dithiothreitol
GTP:	Guanosintriphosphat
HDL:	High Density Lipoprotein
IGF-2:	Insulin-like growth factor 2
IGFBP2:	Insulin-like growth factor binding protein 2
kb:	Kilobasen
kDa:	Kilodalton
LBD:	Liganden-Bindungsdomäne
LBP:	Ligandenbindungstasche

LNCaP-Zellen:	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
MAIS:	minimale Androgenresistenz
mRNA:	messenger Ribonukleinsäure
MTT:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid
NLS:	Kernlokalisierungssignal
NTD:	N-terminale Domäne
NTP:	Nukleosidtriphosphat
PAIS:	partielle Androgenresistenz
PNS:	Peripheres Nervensystem
RBP4:	Retinolbindungsprotein 4
RNA:	Ribonukleinsäure
rpm:	rounds per minute
RT-PCR:	Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
SDS:	Natriumdodecylsulfat
TEMED:	Tetramethylethyldiamin
Tris:	Trishydroxymethylaminomethan
UTP:	Uridintriphosphat
VHF:	Vorhautfibroblasten
VLDL:	Very Low Density Lipoprotein
WV:	Wachstumsversuch
ZNS:	Zentrales Nervensystem

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Androgenbiosynthese, der klassische und alternative Syntheseweg.....	11
Abbildung 2: Struktur des Androgenrezeptors.....	13
Abbildung 3: Wirkungsweise der Androgene in der Zielzelle.....	15
Abbildung 4: Makroskopisches Bild der Integra®-Matrix.....	17
Abbildung 5: Aufteilung der Vorhautfibroblastenkulturen in die einzelnen Versuchsgruppen.....	20
Abbildung 6: Darstellung der aus Integra®-Matrix-Kulturen isolierten Proteinmenge beider Individuen jeweils ohne und mit DHT-Zusatz im Kulturmedium zu den Zeitpunkten Tag 2, 5, 8, 11 und 14, die photometrisch mit dem BioRad Protein Assay nach der Microassay Methode bestimmt wurde.....	39
Abbildung 7: Darstellung der aus Integra®-Matrix-Kulturen isolierten RNA-Menge beider Individuen jeweils ohne und mit DHT-Zusatz im Kulturmedium zu den Zeitpunkten Tag 2, 5, 8, 11 und 14, die photometrisch mit dem FluoStar OPTIMA Photometer von Labtech bestimmt wurde.....	39
Abbildung 8: Darstellung der Lichtabsorption bei 570 nm durch das von vitalen Vorhautfibroblasten der Integra®-Matrix-Kulturen gebildete Formazan, die photometrisch mit dem BioPhotometer von Eppendorf bestimmt wurde.....	40
Abbildung 9: Aufteilung der Vorhautfibroblastenkulturen in die einzelnen Versuchsgruppen.....	41
Abbildung 10: Exemplarische Abbildung der immunhistologischen Färbung des Androgenrezeptors aller untersuchter Zellreihen und Kulturbedingungen (630-fache Vergrößerung).....	44
Abbildung 11: Exemplarische Darstellung eines Westernblots.....	45
Abbildung 12: Grafische Darstellung der Ratio AR/GAPDH der vier unterschiedlichen Kulturbedingungen der Vorhautfibroblasten der 11 Probanden an Tag 5 als Boxplot.....	46
Abbildung 13: Grafische Darstellung der relativen Expressionsdaten der Androgenrezeptor-RNA als normalisierte Ratio AR/GAPDH der vier unterschiedlichen Kulturbedingungen der Vorhautfibroblasten der 11 Probanden an Tag 5 als Boxplot.....	48

Abbildung 14: Grafische Darstellung der relativen Expressionsdaten der IGFBP2-RNA
als normalisierte Ratio IGFBP2/GAPDH der vier unterschiedlichen
Kulturbedingungen der Vorhautfibroblasten der 11 Probanden an Tag 5 als Boxplot 50

Abbildung 15: Grafische Darstellung der relativen Expressionsdaten der ApoD-RNA
als normalisierte Ratio ApoD/GAPDH der vier unterschiedlichen Kulturbedingungen
der Vorhautfibroblasten der 11 Probanden an Tag 5 als Boxplot 52

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inkubationszeiten der immunhistologischen Färbung.....	27
Tabelle 2: Ratio AR/GAPDH der vier unterschiedlichen Kulturbedingungen der Vorhautfibroblasten der 11 Probanden an Tag 5	46
Tabelle 3: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur vergleichenden Analyse der Ratio AR/GAPDH unter den vier Kulturbedingungen an Tag 5.	47
Tabelle 4: Normalisierte Ratio AR/GAPDH der vier unterschiedlichen Kulturbedingungen der Vorhautfibroblasten der 11 Probanden an Tag 5	48
Tabelle 5: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur Analyse der Expression des Androgenrezeptors normalisiert mit GAPDH unter den vier Kulturbedingungen an Tag 5.....	49
Tabelle 6: Normalisierte Ratio IGFBP2/GAPDH der vier unterschiedlichen Kulturbedingungen der Vorhautfibroblasten der 11 Probanden an Tag 5	50
Tabelle 7: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur Analyse der Expression von IGFBP2 normalisiert mit GAPDH unter den vier Kulturbedingungen an Tag 5	51
Tabelle 8: Normalisierte Ratio ApoD/GAPDH der vier unterschiedlichen Kulturbedingungen der Vorhautfibroblasten der 11 Probanden an Tag 5	52
Tabelle 9: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur Analyse der Expression von ApoD als normalisierte Ratio mit GAPDH unter den vier Kulturbedingungen an Tag 5	53

1 Einleitung

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und macht ca. 10 % des Körpergewichts eines Erwachsenen aus (Ng und Lau, 2015). Kommt es zu ausgedehnten und in die Tiefe reichenden Verletzungen, so bedürfen diese häufig einer Versorgung mittels Hauttransplantation. Bei den Transplantaten handelt es sich in der Regel um autologe Voll- oder Spalthaut. Dieses Vorgehen birgt jedoch einige Einschränkungen und Risiken: So steht zum einen nur eine begrenzte Menge an Spenderhaut zur Verfügung, zum anderen steigt das Infektionsrisiko durch die Schaffung weiterer Wundflächen (Shevchenko et al., 2010, Weng et al., 2021). Ein artifizieller Hautersatz würde hier Abhilfe schaffen. In der Vergangenheit wurden bereits große Fortschritte beim Tissue Engineering der Haut gemacht. Noch bestehen aber einige Limitationen, die weitere Optimierungen und Entwicklungen erforderlich machen (Weng et al., 2021). Ein Hautareal, das bei dieser Entwicklung bisher wenig bedacht wurde, ist die Genitalhaut. Dies mag daran liegen, dass Verletzungen und Verbrennungen im Genitalbereich selten sind (Mirastschijski et al., 2020). Dennoch ist auch hier die Entwicklung eines Hautersatzes von zunehmendem Interesse. Dieser könnte nicht nur zur Rekonstruktion nach Verletzungen oder Verbrennungen, sondern auch in der Fehlbildungschirurgie und bei geschlechtsangleichenden Operationen zum Einsatz kommen.

Gleichzeitig besteht in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie ein Interesse an artifiziellen Hautmodellen für die Testung von neuen Medikamenten und Kosmetika. Hier könnten Modelle gesunder und erkrankter Haut in Abhängigkeit von der Fragestellung zum Einsatz kommen. Auf diese Weise könnten Tierversuche reduziert oder gar ersetzt werden (Moniz et al., 2020). Dies hätte mehrere Vorteile: Es bestünden keine ethischen Konflikte in Bezug auf Tierversuche mehr, zudem wäre die Übertragbarkeit der Testergebnisse auf den Menschen durch den Einsatz humaner Zellen im Tissue Engineering höher und zuletzt wären solche Modelle auf langfristige Sicht weniger kostenintensiv (Moysidou et al., 2021).

Darüber hinaus birgt ein solcher Genitalhautersatz das Potential als dreidimensionale Zellkultur zur Erforschung der komplexen Vorgänge der Geschlechtsentwicklung und ihrer möglichen Störungen zu dienen. Dreidimensionale Kulturmodelle gewinnen in der Zellbiologie zunehmend an Bedeutung. Hierbei handelt es sich um Kulturmodelle, die durch

das Vorhandensein einer dreidimensionalen Gerüststruktur den zu kultivierenden Zellen eine Besiedlung entlang des Gerüsts und somit ein Wachstum in einem dreidimensionalen Zellverbund ermöglichen. Im Gegensatz hierzu werden bei Monolayerkulturen lediglich Flächen besiedelt, was einen ausschließlich zweidimensional angelegten Zellverbund zur Folge hat (Duval et al., 2017, Jensen und Teng, 2020). Es ist aber anzunehmen, dass Genitalhautzellen in einem dreidimensionalen Gerüst durch die höhere Zelldichte und die dreidimensionale Anordnung mehr und womöglich auch andere Zell-zu-Zell-Interaktionen zeigen, die wiederum Einfluss auf die Vorgänge der Geschlechtsentwicklung haben und dem In-vivo-Zustand eher entsprechen.

Die Entwicklung eines dreidimensionalen genitalen Dermismodells als erster Schritt in Richtung eines Genitalhautersatzes, zunächst aber vor allem als experimentelle Versuchseinheit, war das Ziel dieser Arbeit.

Die erste Verwendung des hier entwickelten Dermismodells als Versuchseinheit erfolgte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit und hatte das Ziel, potenzielle Androgen-responsive Gene in Vorhautfibroblasten nachzuweisen. Deren Kenntnis ist von großem Interesse für die DSD-Forschung. DSD steht für eine Störung/Variante in der Geschlechtsentwicklung (Disorder/Difference of Sex Development, DSD). Der Fokus lag hier auf dem Androgenrezeptor und den Androgen-vermittelten Signalwegen.

1.1 Die Genitalhaut

Die Haut wird in 3 Schichten unterteilt: Epidermis, Dermis und Subkutis. Die äußerste Schicht ist die Epidermis, die sich wiederum in 4 Schichten (Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum) unterteilen lässt. Sie besteht aus Keratinozyten, Pigment-bildenden Melanozyten und zum Immunsystem gehörigen Langerhans-Zellen und Merkelzellen. Die unter der Epidermis liegende Dermis kann in die papilläre und retikuläre Dermis eingeteilt werden (Lüllmann-Rauch, 2003). Der hier vorherrschende Zelltyp sind Fibroblasten, die die vorwiegend aus Kollagen und Elastin bestehende Extrazellulärmatrix produzieren. Auch kleinere Blutgefäße, Nerven und verschiedene Hautanhängsel wie beispielsweise Schweiß- und Talgdrüsen lassen sich hier finden. Durch die hierunter liegende vorwiegend aus Adipozyten bestehende Subkutis ziehen die größeren Blut- und lymphatischen Gefäße (Moniz et al., 2020).

Die Genitalhaut unterscheidet sich in einigen Aspekten von der Haut anderer Körperareale. So fehlen im Bereich der Genitalhaut die Haare und statt einer verhornten Oberschicht liegt teilweise Schleimhautepithel vor. Zudem ist ihre Struktur insgesamt loser und enthält mehr elastische Fasern und weniger Kollagen. Auch die Abgrenzung von papillärer und retikulärer Dermis ist weniger ausgeprägt (Mirastschijski et al., 2020).

1.2 Tissue-Engineering

Der Begriff „Tissue Engineering“ wurde 1987 eingeführt und als Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieurs- und Biowissenschaften zum Erlangen eines grundlegenden Verständnisses der Struktur-Funktions-Beziehungen in normalen und pathologischen Geweben definiert. Für die Entwicklung von biologischen Ersatzstoffen zur Wiederherstellung, zum Erhalt oder zur Verbesserung einer normalen Organ- oder Gewebefunktion folgt es den Prinzipien der Materialwissenschaft, dem Ingenieurwesen und der Zellübertragung (Atala et al., 2015). Ziel ist es, durch die Besiedlung eines biologisch abbaubaren Materials mit den entsprechenden Zellen und deren Versorgung mit allen notwendigen Substraten, ein wachsendes Modell des Zielorgans oder -gewebes zu schaffen (Moysidou et al., 2021).

Als dreidimensionale Zellkultur wird eine in vitro vorliegende gewebsspezifische Mikroumgebung bezeichnet, die es individuellen Zellen ermöglicht zu wachsen, ihre dreidimensionale Struktur und Funktion zu behalten und mit den umgebenden Strukturen und Zellen so zu interagieren, dass ein suffizientes Signalnetzwerk entsteht (Moysidou et al., 2021). Durch Kombination von 3D-Zellbiologie und Tissue Engineering können Gewebe- und Organmodelle geschaffen werden, die als dreidimensionale Zellkulturen fungieren.

Für die Entwicklung eines Gewebe- oder Organmodells, das als therapeutischer Ersatz oder als dreidimensionale Zellkultur eingesetzt werden soll, müssen drei Grundpfeiler definiert werden: das Material der Gerüststruktur, die besiedelnden Zellen und die Umgebungsparameter wie beispielsweise Wachstumshormone oder Zytokine (Rashidbenam et al., 2019).

Als Gerüstmaterial können natürliche und synthetische Materialien dienen. Zudem kommen dezellularisierte Gerüste ebenso wie Hydrogele bestehend aus vernetzten hydrophilen Polymeren zum Einsatz. Die Wahl des richtigen Materials kann jedoch

schwierig sein. Das Material muss den besiedelnden Zellen die notwendigen Angriffspunkte zur Adhäsion, Proliferation, Differenzierung und Reifung geben. Zudem sollte es die notwendigen Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Gerüst-Interaktionen wie im zu imitierenden Gewebe ermöglichen, so dass eine Selbstorganisation der Zellen erfolgen kann (Afewerki et al., 2018, Moysidou et al., 2021). Bei der Wahl sollte zudem auf Biokompatibilität, Stärke, Elastizität, Porosität, das Vorhandensein von molekularen Gradienten sowie auf den Zugang zu Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Sauerstoff geachtet werden (Sitarski et al., 2018). Als natürliche Materialien stehen beispielsweise Bestandteile der Extrazellulärmatrix wie Kollagen, Laminin oder Hyaluronsäure zur Verfügung, aber auch andere natürliche Stoffe, die nicht in der Extrazellulärmatrix vorkommen, wie Chitin oder Alginat werden genutzt (Weng et al., 2021). Bei den synthetischen Materialien kommen beispielsweise Polyethylenglykol und Propylenglykoldiacetat zum Einsatz (Afewerki et al., 2018, Nikolova und Chavali, 2019). Auch Kombinationen aus natürlichen und synthetischen Materialien sind möglich (Weng et al., 2021). Die Herstellung der Gerüste erfolgt mittels verschiedenster Techniken wie beispielsweise Electrospinning, Freeze-drying, Solvent Casting, Salt Leaching oder Gas Foaming in Abhängigkeit von den genutzten Materialien und dem angestrebten Modell (Nikolova und Chavali, 2019). Die Entwicklung neuer Techniken wie dem 3D-Drucken erlaubt in Kombination mit neuen Biomaterialien immer präzisere Abbildungen komplexer Gewebsstrukturen herzustellen (Weng et al., 2021).

Die für die Besiedlung verwendeten Zellen stammen meist aus etablierten Zelllinien oder werden als primäre Zellen aus Gewebeproben des zu imitierenden Gewebes gewonnen. Der Vorteil primärer Zellen ist, dass sie die morphologischen und funktionellen Eigenschaften des entsprechenden Gewebes oder Organs besitzen. Nachteilig ist, dass ihre Kultivierung schwierig, die Proliferationsrate abhängig von der Gewebeentität niedrig und die Lebensdauer verkürzt sein kann. Zudem kann es im Laufe der Zeit zum Verlust zellspezifischer Eigenschaften kommen. Auch die Reproduzierbarkeit von Versuchsergebnissen kann aufgrund unterschiedlicher Gewebeproben eingeschränkt sein (Benam et al., 2015). Daher werden in neuerer Zeit immer häufiger Stammzellen für das Tissue Engineering genutzt. Sie sind vielseitige und für verschiedene Anwendungen nutzbare Zellen, da sie die Fähigkeiten besitzen sich selbst zu erneuern und sich in verschiedene Zelltypen differenzieren können. Zu den genutzten Stammzellen gehören

embryonale Stammzelllinien (ESCs), induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) und mesenchymale Stammzellen (MSCs) (Benam et al., 2015, Khademhosseini und Langer, 2016, Moysidou et al., 2021). Mehrere unterschiedliche Zelltypen, wie es auch bei allen Geweben im menschlichen Körper der Fall ist, kommen in sogenannten Organoiden vor (Lancaster und Huch, 2019).

Neben der Gerüststruktur und den besiedelnden Zellen werden unterschiedliche biochemische Boten- und Nährstoffe benötigt, die das Zellwachstum, die Zellinteraktion und -organisation beeinflussen. Da die in vitro geschaffenen Gewebe keine Versorgung über Blutgefäße besitzen, haben das Zellkulturmedium, die Biomaterialien der Gerüststruktur und die Extrazellulärmatrixkomponenten die Aufgabe den Zellen Nähr- und Botenstoffe sowie weitere lösliche Komponenten zur Verfügung zu stellen (Afewerki et al., 2019, Moysidou et al., 2021). Hierfür können dem Zellkulturmedium weitere Stoffe wie beispielsweise Wachstumshormone oder Zytokine hinzugefügt werden. Diese beeinflussen zusätzlich das Zellwachstum, das Zellverhalten und die Zellinteraktionen und prägen damit den Charakter des Gewebes (Moysidou et al., 2021). Weitere Einflussfaktoren auf das Zellverhalten sind darüber hinaus mechanische und physikalische Reize. So beeinflussen Scherkräfte durch Flüssigkeitsbewegungen, ebenso wie die wiederholte mechanische Dehnung der Gewebe oder das Anlegen eines elektrischen oder magnetischen Feldes das Zellverhalten (Mihic et al., 2014, Delon et al., 2019, Moysidou et al., 2021).

1.2.1 Tissue Engineering der Haut

Es existieren bereits mittels Tissue Engineering erschaffene Hautmodelle, die zur Wundversorgung bei Patienten sowie als dreidimensionale Zellkulturen in der Forschung eingesetzt werden. Ein vollständiger, alle Anforderungen erfüllender Hautersatz konnte aber bisher nicht entwickelt werden. So sollte ein Hautersatz eine Barrierefunktion besitzen, aber durchlässig für Wasser sein. Er sollte eine möglichst geringe Inflammationsreaktion auslösen und weder lokal noch systemisch toxisch sein. Zudem muss er gut auf Wundflächen anhaften und die entsprechenden mechanischen und physikalischen Eigenschaften der Haut besitzen. Des Weiteren sollte er steril und im Verlauf abbaubar sein (MacNeil, 2007). Wünschenswert ist auch eine einfache Handhabung, eine

Anpassungsfähigkeit an unregelmäßige Wundflächen sowie die Förderung der Angiogenese (Vig et al., 2017).

Kommerziell verfügbare, industriell hergestellte zelluläre allogene Hautersatzprodukte sind beispielsweise TransCyte® oder Dermagraft®. Diese temporär nutzbaren Hautersatzprodukte bestehen aus einer Netzstruktur oder Matrix, die mit neonatalen Fibroblasten besiedelt ist (Vig et al., 2017). Es existieren aber auch Produkte wie beispielsweise Orcel®, bei denen eine Kombination aus neonatalen Fibroblasten und Keratinozyten vorliegt. Auch hier handelt es sich um einen temporären Ersatz. Ein zellulärer autologer Hautersatz hingegen bietet eine permanente Lösung. Bei den kultivierten epidermalen Autotransplantaten (Cultured Epidermal Autograft, CEA) werden Keratinozyten aus Hautbiopsien zunächst kultiviert und dann übertragen. Durch die Zellkulturtechnik von Rheinwald und Green, bei der Keratinozyten in klonaler Zelldichte auf einer Schicht aus tödlich bestrahlten Mausfibroblasten angezüchtet werden, können hierfür ausreichend viele Zellen aus einer kleinen Hautbiopsie des Patienten gewonnen werden (Horch et al., 2005). CEA sind mit verschiedenen Trägersubstanzen kommerziell erhältlich (Vig et al., 2017). Hyalograft 3D® ist dagegen ein Beispiel für einen autologen Dermisersatz, bei dem Fibroblasten in einem auf Hyaluronsäure basierenden Gerüst kultiviert werden. Des Weiteren gibt es sogenannte kultivierte Hautersätze (Cultured Skin Substitutes, CSS), die aus epidermalen und dermalen Komponenten bestehen (Horch et al., 2005). Auch hier stehen verschiedene kommerzielle Versionen mit unterschiedlichen Gerüststrukturen zur Verfügung. Ein Beispiel ist Permaderm®, bei dem autologe Fibroblasten und Keratinozyten in einem Kollagengerüst kultiviert werden (Vig et al., 2017). Mehrere Forschungsgruppen haben zudem dreilagige Hautmodelle entwickelt, die neben Epidermis und Dermis auch eine Adipozyten-haltige Subkutis vorweisen (Monfort et al., 2013).

Neben Keratinozyten und Fibroblasten werden auch beim Tissue Engineering der Haut zunehmend Stammzellen, insbesondere mesenchymale Stammzellen, genutzt, da diese sich in unterschiedliche Zellarten differenzieren können. Zudem besitzen sie angiogene, immunmodulatorische und parakrine Signalfunktionen (Yu et al., 2019). Insbesondere ihre die Wundheilung begünstigenden Eigenschaften wirken sich positiv aus (Chen et al., 2017).

Neben dem klassischen Tissue Engineering gewinnt auch im Bereich der Haut der 3D-Druck zunehmend an Bedeutung. Er ermöglicht die Erschaffung von lebenden Geweben, indem

biologische Materialien und Zellen präzise Schicht für Schicht aufgebracht werden (Murphy und Atala, 2014). Anspruchsvoll ist hierbei die richtige Kombination aus Geometrie, kompatiblen „Tinten“ (Bio-Inks), Drucktechniken und das sich an den Druck anschließende Reifungsprozedere zu finden (Yu et al., 2019). Initial erfolgt ein computergestützter Entwurf des 3D-Modells. Dieser Entwurf gibt die gewünschte Geometrie und innere Struktur sowie die Positionen der Bio-Ink-Bestandteile wieder (Yan et al., 2018). Bei den für den Druck verwendeten Materialien gibt es wie auch bei anderen Organen eine große Auswahl. So kann auch hier zwischen Biomaterialien wie Kollagen und synthetischen Materialien sowie einer Kombination aus beiden gewählt werden. Diese Wahl beeinflusst dann auch die Entscheidung, welche Technik zur Herstellung des 3D-Drucks angewendet wird (Yu et al., 2019). Als besiedelnde Zellen werden aktuell vor allem Fibroblasten und Keratinozyten sowie Stammzellen verwendet. Um einen lebenserhaltenden Ersatz zu schaffen, gibt es zudem Bestrebungen auch Melanozyten und Endothelzellen in die Hautmodelle zu integrieren. Aber auch komplexere Bestandteile der Haut, wie die Hautanhangsgebilde und Gefäße, sollen in der Zukunft integriert werden (Weng et al., 2021). So erschufen Kim et al. 2019 bereits ein dreischichtiges vaskularisiertes Hautmodell. Dies zeigt, was für eine vielversprechende Technik der 3D-Druck ist.

1.2.2 Tissue Engineering des Urogenitaltrakts

Der Schwerpunkt des Tissue Engineerings liegt hinsichtlich des Urogenitaltrakts auf der Entwicklung eines Urethraersatzes. Krankheitsbilder wie schwere Hypospadien bedürfen häufig mehrzeitiger Korrekturoperationen, bei denen zum Teil Präputium- und Mundschleimhaut als Ersatz genutzt werden. Doch auch hier besteht eine Limitation in der Menge des für die Rekonstruktion nutzbaren Gewebes. Auf der Suche nach innovativen Behandlungsmöglichkeiten steht daher die Frage im Mittelpunkt, wie die fehlenden genitalen Gewebe ersetzt werden können (De Kemp et al., 2015). Verschiedene Forschungsgruppen versuchen eine Antwort mit den bereits beschriebenen Techniken des Tissue Engineering zu finden. Durch den Einsatz einer azellulären tubulären Matrix können urethrale Defekte zwar schon erfolgreich regeneriert werden, nur ist dies auf kurze Defekte mit einer maximalen Größe von 0,5 cm limitiert (Chen et al., 2012). Daher werden auch hier mit Zellen besiedelte Gerüststrukturen genutzt. So besiedelten Feng et al. 2011 beispielsweise eine porcine azelluläre Corpus spongiosum Matrix (ACSM) mit autologen

glatten Muskelzellen und linguale Keratinozyten eines Kaninchens, die daraufhin eine Epithelschicht und organisierte Muskelfaserbündel bildeten. Ein am Patienten bereits eingesetztes Transplantat wurde von Raya-Rivera entwickelt. Es handelt sich dabei um ein mit autologen urothelialen Zellen und glatten Muskelzellen besiedeltes, röhrenförmiges Polyglykolsäure:Poly(laktid-co-glykolid)-Gerüst, das bei 5 Jungen erfolgreich als tubuläres Transplantat Verwendung fand (Raya-Rivera et al., 2011).

1.3 DSD-Forschung

Die Abkürzung „DSD“ steht für „Disorder/Difference of Sex Development“ und damit für eine Störung bzw. Variante in der Geschlechtsentwicklung. Diese liegt vor, wenn bei einem Menschen der Chromosomensatz, die Ausprägung der Gonaden und der Phänotyp nicht übereinstimmen.

Bestandteil der DSD-Forschung ist neben der Erforschung der Störungen/Varianten der Geschlechtsentwicklung auch die Grundlagenforschung über die physiologische Geschlechtsentwicklung. Unsere Arbeitsgruppe legt hier einen Schwerpunkt auf die Geschlechtsentwicklung bei 46, XY-Karyotyp und die Androgen-vermittelten Signalwege. Das in dieser Arbeit entwickelte genitale Dermismodell soll in diesem Rahmen zunächst für den Nachweis potenzieller Androgen-responsiver Gene bei gesunden Probanden Anwendung finden und damit weitere Aufschlüsse zu den Androgen-vermittelten Signalwegen geben. Um einen Überblick über die Androgen-vermittelten Signalwege zu gewinnen, werden die Androgene, der Androgenrezeptor und dessen Funktion im Folgenden beschrieben.

1.3.1 Androgene

Als Androgene werden die männlichen Sexualhormone bezeichnet. Es handelt sich um C-19-Steroidhormone, deren Hauptvertreter Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) sind (Drucker, 1977, Schiffer et al., 2018). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Geschlechtsdifferenzierung bei 46, XY-Karyotyp, der Ausprägung ihrer Geschlechtsmerkmale, deren Funktion sowie bei der Reproduktion (Patrão et al., 2009, Flück und Pandey, 2014). Aber auch andere Organe und Organsysteme wie beispielsweise

Knochen, Muskeln, Haare und das Gehirn werden durch sie beeinflusst (Naamneh Elzenaty et al., 2022).

1.3.2 Die Androgenbiosynthese

Der Hauptsyntheseort der Androgene bei 46, XY-Karyotyp sind die Leydig-Zellen der Hoden (Payne und Youngblood, 1995). Ausgangspunkt für die Synthese aller Steroidhormone ist Cholesterin (Payne und Youngblood, 1995, Kraemer et al., 2004, Miller und Auchus, 2011). Das für die Androgenbiosynthese benötigte Cholesterin wird entweder aus dem Blutkreislauf in die Leydig-Zellen aufgenommen, dort de novo synthetisiert oder der Zellmembran entnommen (Scott et al., 2009, Kraemer et al., 2004). Sein Transport in die Mitochondrien erfolgt durch das Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) (Arakane et al., 1998, Naamneh Elzenaty et al., 2022). Hier wird durch die Abspaltung einer Seitenkette Pregnenolon gebildet. Dieser Vorgang wird dort durch das Enzym CYP11A1 (Cytochrome+ P450 Family 11 Subfamily A Member 1) und seinen Kofaktoren Ferrodoxin und Ferrodoxin-Reduktase katalysiert (Hume et al., 1984, Payne und Hales, 2004, Udhane und Flück, 2016). Pregnenolon gelangt aus den Mitochondrien zum glatten endoplasmatischen Retikulum, wo die weiteren Syntheseschritte zum Testosteron ablaufen. Diese werden durch die Enzyme CYP17A1 (Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1), 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (HSD3B) und 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (HSD17B) katalysiert, wobei es zwei mögliche Synthesewege gibt. Beim Menschen wird die größte Menge Testosteron durch die Umwandlung von Pregnenolon zu Androstendion über die Zwischenprodukte Δ^5 Steroid Pregnenolon, 17 α -Hydroxypregnenolon und Dehydroepiandrosteron (DHEA) gebildet. Verantwortlich für diese Umwandlungen sind die 17-Hydroxylase- und die 17,20 Lyase-Aktivitäten des CYP17A1 unterstützt durch die Cofaktoren P450 Oxydoreduktase (POR) und Cytochrom b5 (CYB5). DHEA wiederum wird dann durch die HSD3B zu Androstendion umgewandelt. Es ist aber auch die Umwandlung von Pregnenolon zu Androstendion über die Zwischenprodukte Δ^4 Steroid Progesteron und 17 α -Hydroxyprogesteron, katalysiert durch die HSD3B, die 17-Hydroxylase- und die 17,20 Lyase-Aktivität des CYP17A1, möglich. Die Bevorzugung des ersten Syntheseweges ist durch die verminderte 17,20-Lyase-Aktivität bei 17 α -Hydroxyprogesteron im Vergleich zu 17 α -Hydroxypregnenolon begründet (Flück und Pandey, 2014). Zuletzt wird das auf beiden Synthesewegen entstandene Androstendion durch die HSD17B, vor allem dem Isoenzym

Typ 3, zu Testosteron reduziert. Die Konversion des Testosterons zum potenteren Dihydrotestosteron wird durch 2 NADPH-abhängige Isoenzyme der 5 α -Reduktase in den entsprechenden Organen katalysiert (Imperato-McGinley und Zhu, 2002). Neben diesem „klassischen“ Testosteronsyntheseweg existiert noch ein „alternativer“ Weg durch die „Hintertür“, der eine Rolle in der fetalen Geschlechtsdifferenzierung zu spielen scheint. Seine Bedeutung im Laufe des weiteren Lebens ist aber noch unklar. Der „alternative“ trennt sich vom „klassischen“ Weg auf Höhe des 17-Hydroxyprogesteron (17-OH-Progesteron), das über 17-OH-Dihydroprogesteron (17-OH-DHP), 17-OH-Allopregnanolon, Androsteron und Androstandiol durch die Enzyme 5 α -Reduktase Typ 1, AKR1C2/4 (aldo-keto reductase family 1, member C2/4), CYP17A1, HSD17B3/5 und AKR1C2/4 oder HSD17B6 zu Dihydrotestosteron umgewandelt wird (Biaison-Lauber et al., 2013). Des Weiteren kann die Trennung auch auf Höhe des Progesterons erfolgen, das über 5 α -Dihydroprogesteron (5 α -DHP) und Allopregnanolon durch die Enzyme 5 α -Reduktase Typ 1, AKR1C2/4 und CYP17A1 zu 17-OH-Allopregnanolon umgewandelt wird und von dort den gemeinsamen alternativen Syntheseweg zum Dihydrotestosteron nimmt. Zudem werden in der Peripherie weitere aktive Androgene, nämlich das 11-Keto-Testosteron und das 11-Keto-Dihydrotestosteron, über den C11-Oxy-Syntheseweg produziert. In den Nebennieren werden die hierfür benötigten Vorstufen, das 11 β -Hydroxyandrostendion und das 11 β -Hydroxytestosteron, durch das Enzym 11 β -Hydroxylase mittels 11 β -Hydroxylierung von Androstendion und Testosteron hergestellt (Schiffer et al., 2018). Diese gelangen in die peripheren Organe, wo sie über 11-Keto-Androstendion und 11-Keto-Testosteron durch die Enzyme 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2, 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 3 und 5 sowie 5 α -Reduktase Typ 1 und 2 letztendlich zu 11-Keto-Dihydrotestosteron umgewandelt werden (Naamneh Elzenaty et al., 2022).

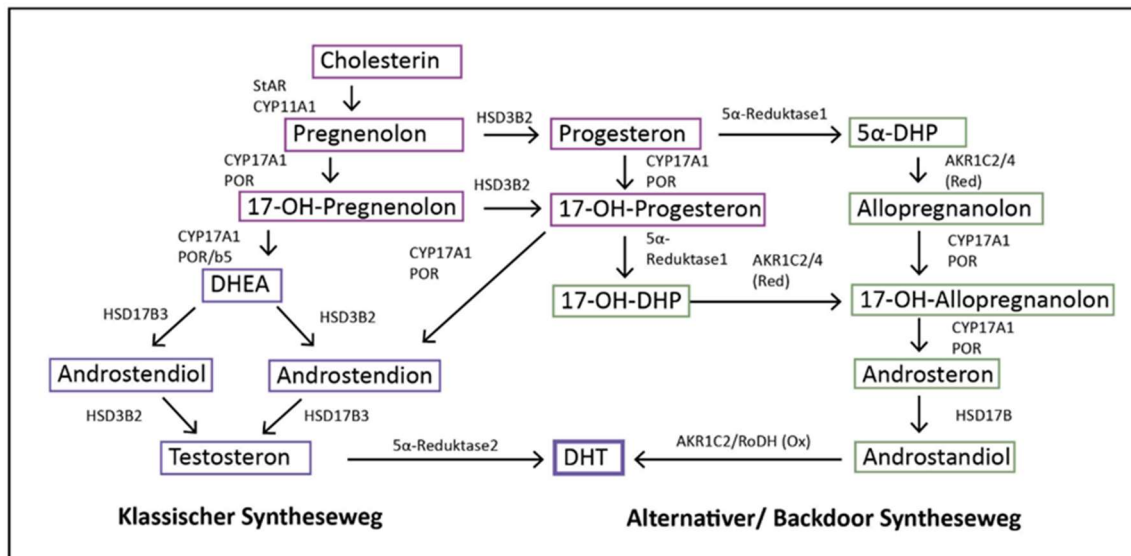


Abbildung 1: Die Androgenbiosynthese, der klassische und alternative Syntheseweg

1.3.3 Struktur und Funktion des Androgenrezeptors

Der Androgenrezeptor (AR) gehört zu der Familie der Steroidrezeptoren. Es handelt sich dabei um einen nukleären Rezeptor von 110 kDa bestehend aus 920 Aminosäuren, der als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor fungiert und auf diese Weise seine Funktion ausübt. Das Gen des Androgenrezeptors befindet sich auf dem X-Chromosom an Position q11-12 und gehört zu den stark konservierten Genen (Brown et al., 1989, Naamneh Elzenaty et al., 2022). Es erstreckt sich über 186 Kilobasenpaare und enthält 8 Exons, eine große 5'-untranslatierte und eine große 3'-untranslatierte Region. Der Androgenrezeptor besteht aus vier verschiedenen Domänen, einer großen N-terminalen Domäne (NTD), codiert durch das Exon 1, einer DNA-Bindungsdomäne (DBD), codiert durch die Exons 2 und 3, einer Liganden-Bindungsdomäne (LBD), codiert durch die Exons 4 bis 8, und einer kleinen Achsendomäne zwischen DBD und LBD, codiert durch das 5'-Ende von Exon 4 (Brinkmann et al., 1989, Faber et al., 1991, Li et al., 2019).

Die NTD ist ein kaum konservierter Bereich des Androgenrezeptors und differiert in Länge und Aminosäurezusammensetzung stark gegenüber anderen Steroidrezeptoren. Zu der NTD gehört die sogenannte activation function 1 (AF1), bestehend aus zwei separaten Transaktivierungseinheiten, TAU-1 und TAU-5 (Chamberlain et al., 1996, Werner und Holterhus, 2014). Diese interagiert mit Transkriptionskoregulatoren wie z. B. der großen Untereinheit RAP74 des Transkriptionsfaktors TFIIF, der eine wichtige Rolle bei der

Steuerung der RNA-Polymerase II und somit bei der Transkription spielt (McEwan und Gustaffson, 1997). Daher scheint die NTD der Teil des Androgenrezeptors zu sein, der mit der Transkriptionsmaschinerie der Zelle interagiert (Simental et al., 1991). Zudem moduliert sie die Bindungsaffinität der DBD gegenüber bestimmten Genen und vermag möglicherweise somit unspezifische Interaktionen des Androgenrezeptors mit der DNA zu verringern (Brodie und McEwan, 2005).

Die DBD ist die am stärksten konservierte Region der nukleären Rezeptoren (Faber et al., 1991). Sie besteht aus 66 Aminosäuren, die 2 Zinkfinger und eine C-terminale Verlängerung formen. Der erste Zinkfinger enthält die sogenannte P-Box, die über Wasserstoffbrücken eine Verbindung mit den DNA-Nukleotiden bildet. Die Bindung des Androgenrezeptors erfolgt an die sogenannten Androgen-responsiven Elemente (ARE), 15 bp messende DNA-Abschnitte in der Nähe der Androgen-responsiven Gene, die wie folgt notiert werden: 5'-(A/G)GAACANNNTGT(T/G)C(C/T)-3' (McEwan, 2012). Für ihre Erkennung scheint die C-terminale Verlängerung eine wichtige Rolle zu spielen (Haelens et al., 2003). Der zweite Zinkfinger enthält die sogenannte D-Box, bestehend aus den Aminosäuren Alanin, Serin, Arginin, Asparagin und Asparaginsäure, die wichtig für die Dimerisierung des Rezeptors und die Stabilisierung des DNA/Rezeptor-Komplexes ist (Shaffer et al., 2004).

Die Achsendomäne (Hingeregion, H) ist eine unter den Steroidrezeptoren nicht konservierte Region. Sie enthält die C-terminale Region der DBD und die Liganden-abhängigen zweiteiligen Kernlokalisierungssignale (NLS), die für den Transfer in den Zellkern durch Bindung an Importin α verantwortlich sind (Claessens et al., 2008). Zudem erfolgen viele der posttranslationalen Modifizierungen des Androgenrezeptors wie Acetylierung, Methylierung, Ubiquitylierung und Phosphorylierung im Bereich der Achsendomäne. Sie fungiert als Anlaufstelle verschiedener Rückkopplungsmechanismen und beeinflusst durch Regulierung der DNA-Bindung, der Rekrutierung von Koaktivatoren und Korepressoren sowie der intramolekularen N/C-Interaktionen die Androgenrezeptoraktivität (Werner und Holterhus, 2014, Li et al., 2019).

Die LBD besteht aus 11 α -Helices und 2 anti-parallelen β -Sheets bestehend aus 4 kurzen β -Strängen, die eine Sandwich-ähnliche Struktur bilden, in deren Inneren sich die sogenannte Ligandenbindungstasche (LBP) befindet. Sie ist verantwortlich für die Interaktion mit steroidalen und nicht-steroidalen Liganden (Matias et al., 2000). Nach Bindung eines

Liganden kommt es zu einer Formveränderung der LBD. Das C-terminale Ende von Helix 12 formt einen Deckel über der LBP, im Weiteren bildet sich die activation function 2 (AF2), die für Protein-Protein-Interaktionen mit koregulierenden Proteinen verantwortlich ist. Diese Interaktion wird u. a. von einem weiteren Teil der LBD, der sogenannten binding function 3 (BF3), der kleine Moleküle bindet, reguliert (Estébanez-Perpiná et al., 2007). Zudem interagiert die AF2 auch mit der FxxLF-Sequenz der NTD, was als N/C-terminale Interaktion bezeichnet wird und eine wichtige Rolle bei der selektiven AR-abhängigen Genexpression spielt (He und Wilson, 2002).



Abbildung 2: Struktur des Androgenrezeptors

Nach Diffusion eines Liganden (Testosteron oder Dihydrotestosteron) in die Zielzelle interagiert dieser mit dem Androgenrezeptor, der sich als Komplex mit Hitzeschockproteinen und Immunophilinchaperonen (u.a. HSP90, HSP70, HSP56 und p23) im Zytoplasma befindet (Heemers und Tindall, 2007). Nach Bindung an den Rezeptor löst sich dieser aus dem Multiproteinkomplex, legt die Kernlokalisierungssignale frei, transloziert in den Kern durch Bindung an das Importin α -Importin β Heterodimer und dimerisiert dort (Jenster et al., 1993, Werner und Holterhus, 2014). Im Zellkern bindet er an die Androgen-responsiven Elemente, die sich am Promotorbereich der Androgen-responsiven Gene befinden und die Transkriptionsmaschinerie der Zelle aktivieren (Shaffer et al., 2004). Zusätzlich beeinflussen eine Reihe von Koregulatoren durch unterschiedliche Mechanismen wie die Steigerung der Androgenrezeptoraktivität, die Modulation der DNA-Bindung, durch Chromatinumgestaltung und Aktivierung andere Koregulatoren die zellspezifische Antwort auf die Androgenrezeptoraktivierung (Heemers und Tindall, 2007). Viele dieser Koregulatoren besitzen zudem eine enzymatische Aktivität, die zu posttranslationalen Modifizierungen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung und ADP-Ribosylierung des Androgenrezeptors führen und

so die Androgenrezeptoraktivität modulieren (Coffey und Robson, 2012). Der Formin- und Aktin-Regulator dishevelled-associated activator of morphogenesis 2 (DAAM2) ist einer dieser Koregulatoren. Durch die Polymerisation von Aktin am Androgenrezeptor steuert er die DHT-stimulierte Androgenrezeptoraktivität. Die durch DHT induzierte DAAM2-vermittelte Aktinpolymerisation führt hierbei zur Bündelung des Androgenrezeptors, der so eine aktive transkriptionsfähige Form annimmt (Knerr et al., 2023).

Die Genexpression kann neben der direkten Beeinflussung über die ARE auch indirekt über die Steigerung anderer Transkriptionsfaktoren oder die Steigerung der Produktion anderer Hormone beeinflusst werden (De Bruyn et al., 2011).

Zudem gibt es auch nicht-genomische Mechanismen, über die Zellen durch Androgene beeinflusst werden z. B. durch Aktivierung von Kinase-assoziierten intrazellulären Signalwegen oder Veränderungen des intrazellulären Calciumgehalts (Foradori et al., 2008, Patrão et al., 2009). Diese nicht-genomischen Mechanismen laufen in der Regel in einem kurzen Zeitraum ab (Zamagni et al., 2019). So induzieren Androgene unter anderem die Bindung des Androgenrezeptors an die Tyrosinkinase Src. Dies führt über die Aktivierung einer MAPK/ERK-Kaskade zur Zunahme der Zellproliferation, indem die Aktivität von AR-unabhängigen Transkriptionsfaktoren im Zellkern beeinflusst wird (Zarif et al., 2015). Des Weiteren unterstützt ERK1/2 das Zellüberleben durch Aktivierung des cAMP-responsiven-Element-Bindungsproteins (Bonni et al., 1999). Das Zellüberleben wird zudem noch durch einen zweiten nicht-genomischen Signalweg des Androgenrezeptors beeinflusst. Über Aktivierung des PI3K/Akt Signalwegs durch direkte Liganden-unabhängige Interaktion des Androgenrezeptors mit PI3K wird die Aktivierung der Akt-Kinase induziert, die wiederum Transkriptionsfaktoren reguliert, die Apoptosevorgänge hemmen (Leung und Sadar, 2017, Zamagni et al., 2019).

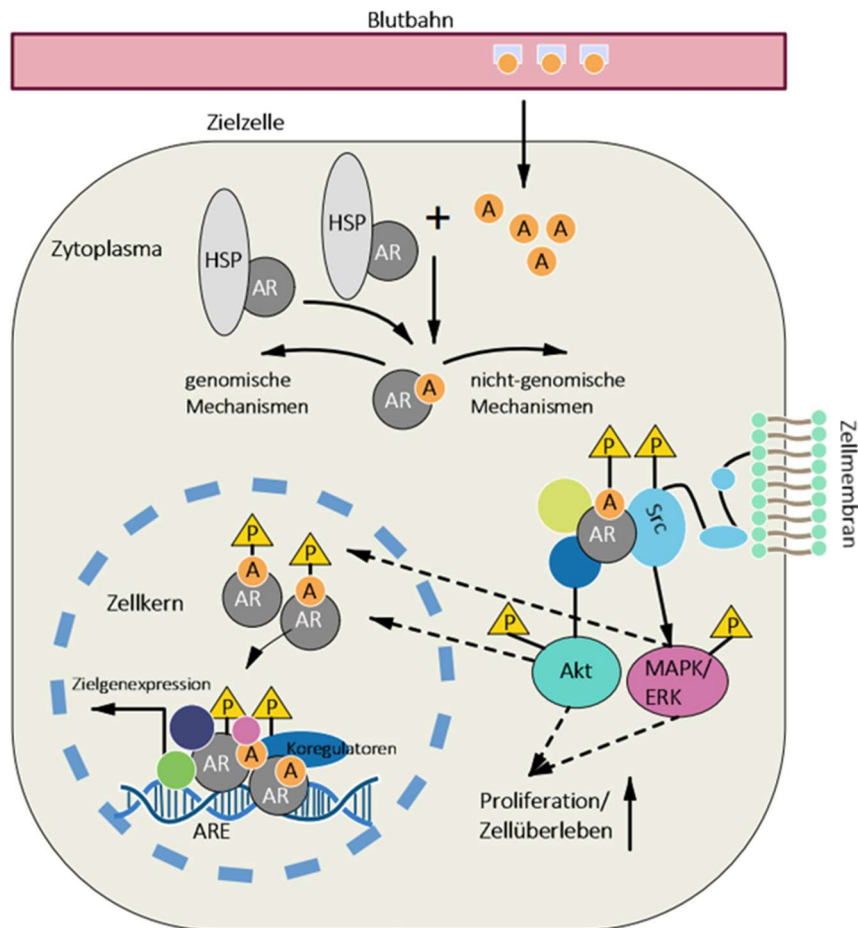


Abbildung 3: Wirkungsweise der Androgene in der Zielzelle (nach Naamneh Elzenaty et al., 2022).
HSP: Hitzeschockproteine, A: Androgene, AR: Androgenrezeptor, ARE: Androgen-responsive Elemente

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

1.4.1 Fragestellung

Auch wenn Verletzungen des Genitalbereichs selten sind, besteht ein Interesse an der Entwicklung eines Genitalhautersatzes. Dieser wäre nicht nur zur Versorgung nach ebensolchen Verletzungen einsetzbar, sondern könnte auch zur Rekonstruktion genitaler Fehlbildungen und bei geschlechtsangleichenden Operationen genutzt werden. Diese stellen Urologen und Chirurgen auch heute noch vor große Herausforderungen, da ein Mangel an benötigtem Gewebe herrscht. Zell-Matrix-Systeme könnten hier die Basis zum „mitwachsenden“ Genitalhautersatz darstellen.

Zudem wären diese auch in der Forschung vielseitig einsetzbar. In der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie könnten sie in der Testung neuer Medikamente und Kosmetika

Verwendung finden. Aber auch in der Grundlagenforschung z.B. zu den Vorgängen der Geschlechtsentwicklung stellen sie eine vielversprechende Versuchseinheit dar. Derzeit erfolgen die In-vitro-Untersuchungen zu den Vorgängen der Geschlechtsentwicklung an Monolayerkulturen, am häufigsten an Vorhautfibroblastenkulturen. Diese können den In-vivo-Zustand allerdings nur eingeschränkt widerspiegeln. In vivo sind die Zellen in einem dreidimensionalen Gewebsverbund angeordnet, so dass andere räumliche Verteilungen der Zellbindungsstellen und andere physikalische Grenzen herrschen. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Monolayerkulturuntersuchungen auf den In-vivo-Zustand ist daher nur mit Vorsicht möglich, da durch die zweidimensionale Anordnung der Zellen einige Zell-zu-Zell-Interaktionen sowie die Interaktion mit der Extrazellulärmatrix eingeschränkt sind. Daher besteht ein hohes Interesse an experimentellen Systemen, die möglichst auch komplexe Aspekte in vitro modellieren können. Bei Probanden mit 46, XY-Karyotyp stellt sich beispielsweise die Frage, ob die dreidimensionale Anordnung der Zellen möglicherweise Einfluss auf deren Expression des Androgenrezeptors und auf die Expression Androgen-responsiver Gene hat, wobei zunächst der Nachweis Androgen-responsiver Gene im Fokus dieser Arbeit steht.

1.4.2 Zielsetzung

1.4.2.1 Entwicklung eines genitalen Dermismodells

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines dreidimensionalen genitalen Dermismodells. Hierfür wurde Integra[®], ein Material der Firma Integra LifeSciences Corporation, als dreidimensionale Matrix genutzt und mit Vorhautfibroblasten gesunder Probanden besiedelt. Um die erfolgreiche Besiedlung der Matrix mit den Vorhautfibroblasten und deren Wachstum innerhalb der Matrix nachzuweisen, erfolgten Messungen der Gesamt-Proteinmenge und der Gesamt-RNA sowie ein MTT-Reduktions-Assay.



Abbildung 4: Makroskopisches Bild der Integra®-Matrix (Homepage der Integra LifeSciences Corporation)

1.4.2.2 Vergleich der Integra®-Matrix-Kulturen mit Monolayerkulturen

Zur Charakterisierung des entwickelten Dermismodells und zur Untersuchung einer möglichen Überlegenheit gegenüber Monolayerkulturen erfolgten vergleichende Untersuchungen der beiden Kulturbedingungen in Bezug auf die Androgenrezeptorexpression auf Protein- und RNA-Ebene sowie in Bezug auf die Expression möglicher Androgen-responsiver Gene. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Apoptosevorgänge zu verhindern, erfolgten die Untersuchungen an sich noch im Wachstum befindenden Vorhautfibroblasten. Hierbei lautete die Studienhypothese, es besteht ein Unterschied zwischen Integra®-Matrix-Kulturen und Monolayerkulturen.

1.4.2.3 Nachweis Androgen-responsiver Gene

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war der Nachweis Androgen-responsiver Gene als eine erste experimentelle Anwendung des entwickelten Dermismodells. Unserer Hypothese nach führt der Zusatz von Dihydrotestosteron (DHT) zum Kulturmedium der Vorhautfibroblasten zu einer Steigerung der Genexpression potenzieller Androgen-responsiver Gene. Daher wurden Vorhautfibroblasten gesunder Probanden mit und ohne Zusatz von 10 nM DHT kultiviert und deren Genexpression vergleichend untersucht. Hierfür wurde eine Dihydrotestosteronkonzentration oberhalb der physiologischen Konzentration eines präpubertären Jungen verwendet, um möglichst aussagekräftige Unterschiede in der Genexpression nachweisen zu können. Es erfolgten RT-PCR-Analysen für die Gene Apolipoprotein D und Insulin-like growth factor binding protein 2. Diese Gene waren bereits

durch Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe als potenzielle Androgen-responsive Gene identifiziert worden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Eine ausführliche Aufstellung der verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Chemikalien findet sich im Anhang dieser Arbeit.

2.2 Ethikvotum und Einverständnis

Die Aufklärungsmaterialien zur Spende von Vorhautgewebe im Rahmen der EuroDSD sind durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck geprüft und genehmigt worden (Ethikantragsnummer: AZ 08-081). In die Spende von Vorhautgewebe und dessen wissenschaftlicher Nutzung wurde durch die Erziehungsberechtigten der Probanden eingewilligt.

Eine weitere Genehmigung der Versuche dieser Arbeit durch die Ethikkommission war zum Zeitpunkt der Versuche nicht notwendig, da keine ethischen Risiken erkennbar waren.

2.3 Methoden

Zu Beginn der Arbeit erfolgte die Etablierung des genitalen Dermismodells. Hierfür besiedelten wir Integra®-Matrix-Stücke mit Vorhautfibroblasten gesunder Probanden und untersuchten deren Wachstumsverhalten in der dreidimensionalen Matrix mittels der Bestimmung des Gesamt-Protein- und Gesamt-RNA-Gehalts sowie mittels eines MTT-Reduktions-Assays wie im Folgenden beschrieben.

Im Anschluss an die Wachstumsversuche wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, die einerseits einen Vergleich von Integra®-Matrix-Kultur zu Monolayerkultur und andererseits den Einfluss vom DHT-Zusatz im Nährmedium (DMEM-Medium + DCC-FCS) auf die Vorhautfibroblasten untersuchte. Hier war der Versuchsaufbau folgender:

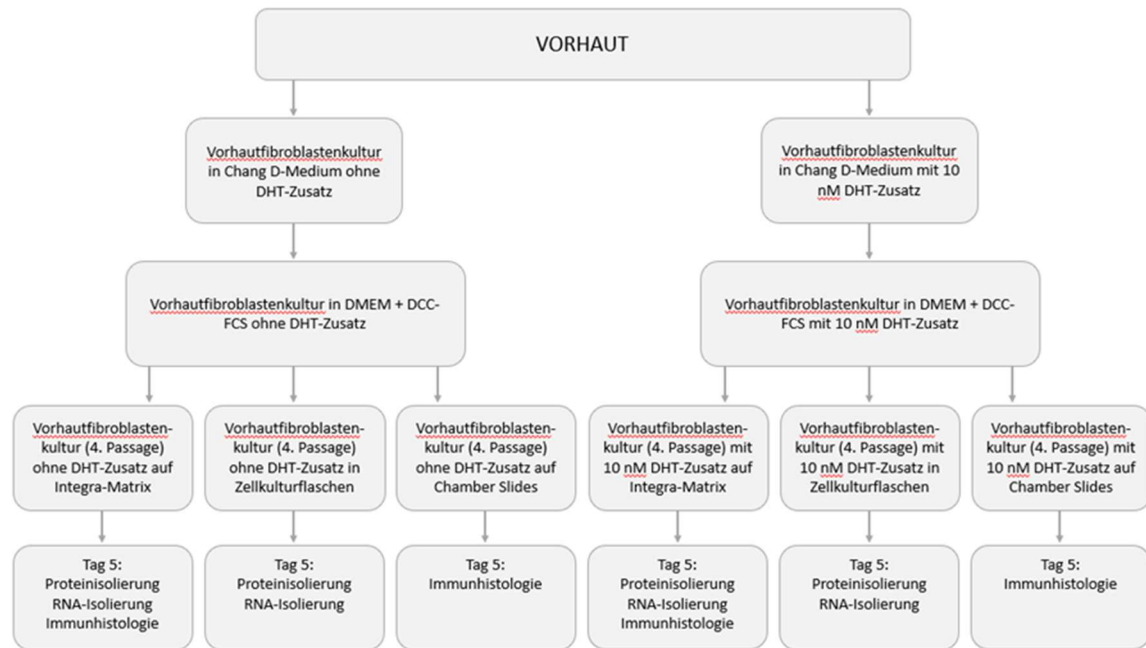


Abbildung 5: Aufteilung der Vorhautfibroblastenkulturen in die einzelnen Versuchsgruppen

2.3.1 Zellkultur

2.3.1.1 Zellkulturmedien

Das Chang D Medium wurde gebrauchsfertig vom Hersteller Trinova Biochem GmbH geliefert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor dem Gebrauch wurde es auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad erwärmt und einmalig mit 2 % Antibiotic-Antimycotic Solution (je 10.000 U Penicillin, 10 mg Streptomycin, 25 μg Amphotericin B pro ml) von Sigma vermischt.

Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) von Sigma wurde nach Anleitung des Herstellers hergestellt (DMEM-Pulver für 5 l mit 6 g NaHCO_3 (MG 84,01 g) in 5 l Aqua dest., pH 7,3), steril filtriert, in 500 ml Flaschen aliquotiert und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor dem ersten Gebrauch wurde jeder 500 ml Flasche 10 % steroidfreies fötales Kälberserum (DCC-FCS) und 1 % Antibiotic-Antimycotic Solution von Sigma hinzugefügt.

Die Lagerung erfolgte bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vor Verwendung wurde das Medium auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad erwärmt. Für die Kryokonservierung wurde das DMEM + DCC-FCS mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) (Einfriermedium) versetzt.

RPMI 1640 Medium mit Glutamin, ohne Phenolrot und ohne NaHCO_3 von Sigma wurde nach Anleitung des Herstellers hergestellt (RPMI 1640-Pulver für 1 l mit 2 g NaHCO_3 (MG 84,01 g) in 1 l Aqua dest., pH 7,2), steril filtriert, in 500 ml Flaschen aliquotiert und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

gelagert. Vor dem ersten Gebrauch wurde jeder 500 ml Flasche 10 % steroidfreies fötales Kälberserum (DCC-FCS) und 1 % Antibiotic-Antimycotic Solution von Sigma hinzugefügt.

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Vor Verwendung wurde das Medium auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Für die Kryokonservierung wurde das RPMI 1640 + DCC-FCS mit 10 % DMSO (Einfriermedium) versetzt.

Steroid-freies fötales Kälberserum:

Zur Herstellung eines steroidfreien fötalen Kälberserums (DCC-FCS) wurde Aktivkohle genutzt, die die Steroide adsorbiert. Zunächst wurde aus 200 ml 10 mM Tris-HCl-Puffer, 5 g Aktivkohle und 0,5 g Dextran eine Suspension hergestellt. Diese wurde über Nacht bei 4 °C gerührt, so dass das Dextran von der Aktivkohle adsorbiert wurde. Dieses sollte verhindern, dass größere Partikel des Mediums, die für das Wachstum der Zellen wichtig sind, neben den Steroiden von der Aktivkohle adsorbiert werden.

Am Folgetag wurde die Suspension in vier 50 ml Röhrchen aliquotiert, für 10 Minuten bei 3000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die vier Kohle-Pellets wurden nun mit 1000 ml fetalem Kälberserum (FCS) resuspendiert und das Gemisch für 2 Stunden bei 0 °C im Eisbad langsam gerührt. Bei diesem Vorgang adsorbierte die Aktivkohle nun selektiv die hormonellen Bestandteile und kleineren Verunreinigungen des FCS. Im Anschluss wurde das FCS durch Filtrierung mittels Filterpapiers von der Aktivkohle gereinigt. Daraufhin wurde das nun Steroid-freie FCS (DCC-FCS) dreimal steril filtriert und als 50 ml Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.1.2 Gewinnung von Vorhautfibroblasten

Die für die Anzucht der Vorhautfibroblasten genutzten Gewebestücke wurden bei Operationen wie z.B. Zirkumzisionsoperationen aufgrund einer vorliegenden Phimose gewonnen. Es wurden von jeweils elf Probanden entsprechende Gewebeproben entnommen. Die Probanden waren zwischen einem und zehn Jahre alt.

2.3.1.3 Anzüchten von Vorhautfibroblasten

Zunächst wurden die gewonnenen Gewebeproben in Quantum-Nährmedium bis zu ihrer Weiterverarbeitung gelagert. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen mit

autoklavierten und sterilen Materialien und Lösungen unter sterilen Werkbänken durchgeführt.

Als Vorbereitung wurden Zellkulturflaschen a 25 cm² mit 2 ml Chang D Medium befüllt, so dass ihr Boden benetzt war.

Die Gewebeprobe wurde nun in eine Petrischale gegeben und das Quantum Medium abgesaugt, ohne das Gewebestück zu beschädigen. Es wurde 1 ml Chang D Medium hinzugefügt. Daraufhin erfolgte das Zerteilen der Gewebeprobe in kleine Stücke mit Hilfe einer Schere. Die zerkleinerten Gewebstücke wurden zusammen mit dem Chang D Medium mit einer 5 ml-Stabpipette aufgenommen und in die Zellkulturflaschen überführt.

In jeder Zellkulturflasche befanden sich am Ende 3 ml Chang D Medium mit Gewebestücken. Es wurden jeweils vier bis sechs Zellkulturen angelegt.

Diese wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe wurden nur mit dem Chang D Medium kultiviert, bei der zweiten Gruppe wurde zusätzlich 10 nM DHT dem Medium hinzugefügt. Nachdem in der Mikroskopie einzelne angewachsene Zellen gesehen wurden, wurde das Chang D Medium gegen DMEM-Medium + DCC-FCS jeweils mit und ohne 10 nM DHT ausgetauscht.

2.3.1.4 Weitere Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle drei Tage durchgeführt. Die Zellen wurden bis zu 80 % Konfluenz kultiviert.

2.3.1.5 Passage und Kryokonservierung der Vorhautfibroblasten

Wenn die Zellen eine Konfluenz von 80 – 90 % erreicht hatten, wurden sie in die nächste Passage überführt.

Das Kulturmedium wurde vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, um das Medium restlos zu entfernen. Der PBS-Puffer wurde ebenfalls vorsichtig abgesaugt. Danach wurden 2 ml 0,05 % Trypsin-EDTA in PBS hinzugegeben und die Zellen bei 37 °C inkubiert, bis sie sich vom Boden der Zellkulturflaschen lösten. Sobald sich die Zellen gelöst hatten, wurden sie mit 10 ml Medium vom Boden der Zellkulturflaschen gespült, was die Trypsinbehandlung stoppte. Das Medium mit den Zellen wurde dann mit einer 10 ml-Pipette aufgenommen und in Harre-Röhrchen überführt. Diese wurden bei 2000 rpm 10

Minuten zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt, ohne das beim Zentrifugieren entstandene Pellet zu beschädigen. Das Pellet wurde daraufhin in 10 ml Medium resuspendiert und in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 15 ml Medium überführt.

Die Kryokonservierung wurde bei einer ca. 80 %-igen Konfluenz in einer 75 cm² Zellkulturflasche durchgeführt. Für diese wurde bis zur Herstellung des Zellpellets wie bereits beschrieben vorgegangen. Die Resuspension erfolgte mit 1,5 ml Einfriermedium (DMEM-Medium + DCC-FCS, 10 % DMSO). Die Suspension wurde in Kryoröhrchen überführt und in einem Einfriergerät der Firma Nalgene mit einer Abkühlrate von 1 °C/min bis -80 °C langsam heruntergekühlt. Nach 24 Stunden erfolgte die endgültige Lagerung der Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff.

2.3.1.6 Integra[®]-Matrix

Die Integra[®]-Matrix der Firma Integra LifeSciences Corporation, entwickelt 1980 von Yannas und Burke, ist ein für die chirurgische Behandlung von Hautläsionen, insbesondere nach Verbrennungen, genutztes Membransystem. Das zweischichtige Membransystem fungiert als Fasergerüst für die Hautregeneration. Es setzt sich aus zwei Schichten, dem Dermis- und dem Epidermiersatz zusammen. Der Dermisersatz besteht aus vernetztem Rindersehnenkollagen und Haifischknorpel-Glykosaminoglykanen (Chondroitin-6-Sulfat), die gemeinsam eine poröse Matrix bilden. Diese dient als Leitstruktur für einsprossende Zellen wie Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und kapillare Endothelzellen. Die epidermale Ersatzschicht besteht aus einer Polysiloxanschicht (Silikon), die den Verlust von Feuchtigkeit über die Wunden regulieren und sie vor mechanischen Einflüssen sowie vor Bakterien schützen soll. Es liegt eine Matrixdicke von 2 mm vor, die Porengröße des Fasergerüsts beträgt 70 – 200 µm.

2.3.1.7 Besiedlung der Integra[®]-Matrix und Chamber Slide

Zur Vorbereitung musste die Integra[®]-Matrix auf die passende Größe zugeschnitten werden. Dazu wurden ein großes Stück Integra[®]-Matrix in eine Petrischale gegeben, mit PBS-Puffer angefeuchtet und mit einer Biopsie-Stanze von der Firma PFM, die einen Durchmesser von 8 mm hatte, entsprechend große Stücke ausgestanzt und die Polysiloxanschicht entfernt. Die so vorbereiteten Stücke wurden bis zur weiteren Verarbeitung in PBS-Puffer gelagert.

Für die Besiedlung wurden Vorhautfibroblastenkulturen aus der vierten Passage genutzt. Zunächst wurde wie oben beschrieben eine Passage der Zellen bis zur Resuspension des Zellpellets in 10 ml frischem DMEM-Medium + DCC-FCS vorgenommen. 50 µl der Zellsuspension wurden 1:1 mit Trypanblau vermischt, mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und die benötigte Verdünnung berechnet, so dass jedes Integra[®]-Matrix-Stück mit je 160.000 Zellen (320.000 Zellen/cm²) besiedelt werden konnte. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und die entsprechend der benötigten Verdünnung berechnete Menge an DMEM-Medium + DCC-FCS hinzugefügt.

Die in PBS-Puffer gelagerten Integra[®]-Matrix-Stücke wurden auf einer Kompresse vom PBS-Puffer befreit und in 48-well Platten überführt. Nun wurden 300 µl Zellsuspension mit je 160.000 Zellen auf sie pipettiert und die 48-well Platten für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C gelagert. Danach wurden noch einmal 700 µl DMEM-Medium + DCC-FCS hinzugegeben, wobei bei einer Gruppe fortführend zusätzlich noch 10 nM DHT dem Medium hinzugefügt wurde.

Die Besiedlung der Chamber Slides erfolgte wie oben beschrieben. In jede der acht Kammern der Chamber Slides wurden je 5000 Zellen überführt und die Kammern bis 300 µl mit Medium aufgefüllt. Es befanden sich somit 5000 Zellen/cm² in jeder Kammer.

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde jeden Tag durchgeführt.

2.3.1.8 LNCaP-Zellen

Androgen-sensitive LNCaP-Zellen (Lymph Node Carcinoma of the Prostate, American Cell Culture collection, ACC256) wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig bezogen und als Positivkontrolle für den immunhistologischen Nachweis des Androgenrezeptors genutzt. Für die Kultivierung der LNCaP-Zellen wurde RPMI 1640 Medium genutzt, ansonsten erfolgte sie analog zu der Kultivierung der Vorhautfibroblasten.

2.3.2 MTT-Reduktions-Assay

Der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) -Reduktions-Assay ist eine Untersuchungsmethode, um den Metabolismus viabler Zellen in Zellkulturen

nachzuweisen. MTT ist ein gelber, wasserlöslicher Farbstoff, der von viablen Zellen mit einem aktiven Metabolismus in das blauviolette, wasserunlösliche Formazan umgewandelt wird. Das Formazan akkumuliert als wasserunlösliches Präzipitat in den Zellen und lagert sich im Zellmedium in der Nähe der Zelloberfläche ab. Nachdem es durch Hinzugabe von DMSO in eine lösliche Form gebracht wurde, kann die Menge des gebildeten Formazans durch die photometrische Messung von Absorptionsänderungen bei 570 nm bestimmt werden. Die Menge des gemessenen Formazans ist proportional zu der Anzahl metabolisch aktiver Zellen (Riss et al., 2013).

In dieser Arbeit wurde der MTT-Reduktions-Assay im Rahmen der Wachstumsversuche eingesetzt, um den Zeitpunkt zu bestimmen, zu dem sich die Vorhautfibroblasten in der Integra[®]-Matrix noch im Wachstum befanden.

Das alte Medium wurde abgesaugt und die Integra[®]-Matrix-Kultur mit frischem Medium, das zuvor mit 50 µl MTT (5 mg/ml) von Sigma vermischt wurde, überschichtet. Es folgte die Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für 3 Stunden. Im Anschluss wurde das Medium entfernt und zu den Integra[®]-Matrix-Stücken 300 µl DMSO hinzugefügt, welches das gebildete Formazan aus den Zellen löste. Wenn sich das gesamte Formazan gelöst hatte, wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt. Als Leerwert für die Absorption wurde ein Integra[®]-Matrix-Stück während der Wachstumsphase nur mit Medium inkubiert, ansonsten aber wie die mit Zellen besiedelten Integra[®]-Matrix-Stücke behandelt. Dieser Leerwert wurde von der gemessenen Absorption der Proben abgezogen.

2.3.3 Immunhistologische Färbung

2.3.3.1 Prinzip

Um eine immunhistologische Färbung durchführen zu können, müssen das Gewebe bzw. die Zellen fixiert werden. Auf diese Weise wird das nachzuweisende Antigen konserviert. Das am häufigsten genutzte Fixierungsmittel ist 4 %-iges Paraformaldehyd. Es bewirkt eine Quervernetzung zwischen den Aldehydresten der Proteine. Diese Quervernetzung kann aber eine Maskierung der Antigene bzw. Epitope zur Folge haben, so dass der spezifische Antikörper nicht mehr binden kann. Um diese Maskierung wieder aufzuheben, werden die Schnitte vor der eigentlichen Färbung vorbehandelt. Die Vorbehandlung kann thermischer oder proteolytischer Art sein. Die Färbung erfolgt dann mittels Antigen-Antikörper Bindung.

Zunächst bindet der Primärantikörper, der spezifisch für das nachzuweisende Antigen ist. An diesen bindet wiederum ein Brückenantikörper, der mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugiert ist. Das Enzym katalysiert die Abspaltung von Phosphatgruppen der angebotenen Chromogene wie die des Liquid Fast Red Substrats, die daraufhin ein rotes Endprodukt bilden. Dieses zeigt das nachzuweisende Antigen an. Um eine starke Hintergrundfärbung zu vermeiden, wird zuvor die unspezifische Alkalische-Phosphatase-Aktivität z. B. mit dem Ultra V Block geblockt. Im Anschluss an die Antikörperfärbung können die Zellkerne mit Hämatoxylin gegengefärbt werden.

2.3.3.2 Durchführung

Vorbereitung der Objektträger:

Die Integra[®]-Matrix-Stücke wurden mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 3 – 5 µm dünne Schnitte hergestellt, die im Wasserbad bei 37 °C entspannt, dann auf beschichtete Objektträger gezogen und für 12 Stunden bei 37 °C im Brutschrank getrocknet wurden.

Als Vorbereitung für die Färbung mussten die Schnitte entparaffiniert werden. Zu diesem Zweck wurden die Paraffinschnitte drei Mal für 10 Minuten in ein Xylobad gegeben, mehrmals auf und ab bewegt und mit einer absteigenden Alkoholreihe (2x 99,9 % Ethanol, 1x 96 % Ethanol, 1x 70 % Ethanol) gespült. Im Anschluss wurden die Schnitte für 5 Minuten in Tris Puffer (43,5 mM Tris-HCl, 7 mM Tris-Base, 150 mM NaCl) + 0,3 % Tween 20 gespült.

Die Zellen der Chamber Slide Kulturen wurden mit einer Methanol/Aceton-Lösung (1:1) fixiert und bei Raumtemperatur getrocknet.

Färbung und Eindecken:

Zur Demaskierung der Antigene wurden die Schnitte in einem Bad mit Epitope Retrieval Solution pH 9 von Novocastra für 45 Minuten im Dampfgerar vorbehandelt. Durch Spülen in Tris Puffer (43,5 mM Tris-HCl, 7 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, pH 7,4 - 7,6) wurde dann die Demaskierung gestoppt.

Für die Färbung wurde der Stainer „Tech Mate“ 500 Plus von Dako genutzt. Das Nachweissystem stammte aus dem UltraVision LP Large Volume Detection System Kit von LAB-Vision. In die dafür vorgesehenen Fächer wurden je 300 µl Ultra V Block, 300 µl des Primärantikörpers (AR 441 von Dako, 1:100 verdünnt), 250 µl des Primary Antibody

Enhancer, 250 µl des AP Polymer anti mouse, 250 µl Hämatoxylin und 500 µl des Chromogens Liquid Fast Red Substrate von LAB-Vision (1:70 verdünnt) gefüllt. Der Primärantikörper AR 441 wurde mit ChemMate Antibody Diluent von Dako 1:100 verdünnt. Die Färbung erfolgte daraufhin automatisch.

Reagenz	Inkubationszeit
Ultra V Block	5 min
AR 441 (1:100 verdünnt)	30 min
Primary Antibody Enhancer	20 min
AP Polymer	30 min
Fast Red (1:70 verdünnt)	15 min

Tabelle 1: Inkubationszeiten der immunhistologischen Färbung

Zwischen allen Inkubationsschritten erfolgte eine Spülung mit Tris Puffer, pH 7,4 - 7,6 (87,5 g NaCl, 68,5 g Tris-Hydrochlorid, 9,0 g Tris-Base in 10 l Aqua destillata). Nach der Färbung wurden die Schnitte kurz mit Leitungswasser, dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1x 70 % Ethanol, 1x 96 % Ethanol, 2x 99,9 % Ethanol) und 3x mit Xylol inkubiert. Daraufhin erfolgte das Eindecken mit Neo-Mount von Merck per Hand.

2.3.4 Proteinanalyse

Alle für die Proteinisolierung durchgeführten Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt, um einen Zerfall der Proteine zu verhindern.

2.3.4.1 Lysispuffer A

Um den Lysispuffer A herzustellen, wurde in 100 ml Puffer C (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 10 % Glycerol, 10 mM DTT, pH 7,4) 1 % Triton X-100, 0,5 % Deoxycholat (DEO) und Natriumdodecylsulfat (SDS) gelöst. Kurz vor dem Gebrauch wurden noch 1 % Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1 % Bacitracin als Proteaseinhibitoren hinzugefügt.

2.3.4.2 Proteinisolierung aus Monolayerkulturen

Zunächst wurde das Medium aus den Flaschen abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Der PBS-Puffer wurde ebenfalls abgesaugt und es wurden 500 µl Lysispuffer A hinzugefügt. Daraufhin erfolgte das Abkratzen der Zellen mit einem Zellschaber. Das Zellgemisch wurde auf eine Shreddersäule (Qiagen) aufgetragen und bei

13.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte das Aliquotieren des Proteinlysats in 5x 100 µl Aliquots, die bei -80 °C gelagert wurden.

2.3.4.3 Proteinisolierung aus Integra®-Matrix-Kulturen

Zu Beginn wurde das Medium aus den 48-well Platten abgesaugt. Die Integra®-Matrix-Stücke wurden mit einer Pinzette aus den wells entnommen und in einer Petrischale mit PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden sie auf einer Kompresse vom PBS-Puffer befreit. Dies erfolgte zweimal. Im Anschluss wurden die Integra®-Matrix-Stücke in einer zweiten Petrischale mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten, die in mit 500 µl Lysispuffer A befüllte Eppendorfgefäße gegeben wurden. Das Herauslösen der Proteine erfolgte über 1 Stunde bei 4 °C auf einem Schüttler. Das Gemisch wurde daraufhin auf eine Shreddersäule aufgetragen und bei 13.000 rpm zentrifugiert. Es erfolgte das Aliquotieren des Proteinlysats in 5x 100 µl Aliquots, die bei -80 °C gelagert wurden.

2.3.4.4 Messung des Proteingehalts

Die Messung des Proteingehalts erfolgte mit dem BioRad Protein Assay. Es wurde die Microassay Methode angewendet.

2.3.5 SDS-PAGE und Westernblot

2.3.5.1 Prinzip

Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

Die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren, bei dem Proteine mit Hilfe einer Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Zu Beginn werden die Proteine denaturiert und durch Bindung von SDS (Natriumdodecylsulfat) mit einer konstanten negativen Ladungsverteilung versehen. Nach Auftragen der Proteine auf ein Acrylamidgel wird eine elektrische Spannung von 100 Volt an das Gel angelegt. Die negativ geladenen Proteine wandern durch das Gel, wobei sie je nach Molekulargewicht eine unterschiedliche Geschwindigkeit aufweisen. Hiermit kommt es zu einer Auftrennung der Proteine im Gel nach ihrem Molekulargewicht.

Westernblot:

Der Westernblot ist ein Verfahren zur Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran, die anschließend mit Hilfe von Antikörpern sicht- und messbar gemacht werden. Beim Blotten wird eine senkrecht zum Acrylamidgel gerichtete elektrische Spannung angelegt und somit die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Blottingmembran) übertragen. Auf dieser können mit Hilfe von spezifischen Antikörpern durch eine Antigen-Antikörper-Bindung die gewünschten Proteine als Banden sichtbar gemacht werden. In der Regel werden Primärantikörper, die sich gegen das spezifische Antigen richten, und Sekundärantikörper, die sich gegen die Fc-Region des Primärantikörpers richten, genutzt. Der Sekundärantikörper ist mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, die eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert. Diese Reaktion kann auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham) sichtbar oder mit einem speziellen digitalen Detektionssystem detektiert werden. Proteinbanden können aber auch unspezifisch mit Ponceau-Lösung dargestellt werden.

2.3.5.2 Durchführung

Gelelektrophorese:

Zum Gießen der Gele wurden die BioRad Outer Glasplatte und die Short Glasplatte aufeinandergelegt und in den Halterahmen eingespannt. Das Trenngel wurde mit der im Anhang stehenden Zusammensetzung hergestellt und zwischen die beiden Glasplatten pipettiert bis der Zwischenraum zu ca. dreiviertel gefüllt war. Das Gel wurde zur Vermeidung von Luftblasen vorsichtig mit Ethanol (100 %) überschichtet und 60 Minuten aushärten gelassen.

Das Ethanol wurde abgegossen und das Gel zweimal mit Aqua bidest. gespült. Das Sammelgel wurde mit der im Anhang stehenden Zusammensetzung hergestellt und zwischen die Glasplatten pipettiert. Es wurden Kämmen luftblasenfrei zwischen die Glasplatten geschoben und das Gel 30 Minuten zum Aushärten stehen gelassen.

Nach Einspannen der Gelplatten in die Halterung der Elektrophorese wurde diese in den Mini-PROTEAN-3-Cell (BioRad) gestellt, der mit gekühltem SDS-haltigem Tris-Glycin-Elektrodenpuffers (0,1 % SDS, 25 mM Tris, 192 mM Glycine, pH 8,3) befüllt wurde. Die Kämmen wurden gezogen und die Geltaschen gespült. Es folgte das Befüllen der Geltaschen

mit dem Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope Marker (BioRad) und den vorbereiteten Proben. Diese wurden zuvor 1:1 mit Laemmli-Puffer (100 mM Tris, 4 % SDS, 20 % Glycerol, 0,002 % Bromphenolblau, 10 nM DTT, pH 6,8) verdünnt und bei 99 °C für 3 Minuten denaturiert. Die Gelelektrophorese lief bei 100 Volt für 80 bis 120 Minuten.

Blot (Membrantransfer):

Für den Membrantransfer wurde das Gel aus den Glasplatten gelöst und das Sammelgel abgeschnitten. Das Trenngel wurde auf ein Filterpapier überführt und die Blottingmembran (Nitrozellulosemembran) daraufgelegt. Der gesamte Blotaufbau entsprach dem Folgendem: Kathode, Schwamm, Filter, Gel, Membran, Filter, Schwamm, Anode. Dieser wurde in die Blothalterung des Tanks hineingeschoben, der zusätzlich einen Magnetprüher und ein Kühlelement enthielt. Der Tank wurde mit gekühltem Blottingpuffer (20 % Methanol, 16,5 mM Tris, 150 mM Glycin, pH 8,3) befüllt und bei 100 Volt 80 Minuten laufen gelassen.

Blockieren:

Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit 5 %-iger Magermilch-Lösung geblockt, diese bestand aus PBS Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) versetzt mit 0,1 % Tween 20 und 5 %-igem Magermilchpulver (Difco, Becton & Dickinson).

Immundetektion:

Alle Antikörper, die für die Immunodetektion genutzt wurden, wurden mit 5 %-iger Magermilch zu den gewünschten Konzentrationen verdünnt.

Zunächst erfolgte die Inkubation der Nitrozellulosemembran mit den Primärantikörpern, Anti-Androgenrezeptor-AK oder Anti-GAPDH-AK, für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Im Anschluss wurde die Nitrozellulosemembran in PBS-Puffer mit 0,1 % Tween für eine Stunde gewaschen, der in dieser Zeit viermal gewechselt wurde. Es schloss sich die Inkubation mit den Sekundärantikörpern, Anti-Mouse-AK und Anti-Rabbit-AK, an, bei der genauso verfahren wurde wie bei der Inkubation mit den Primärantikörpern.

Die Detektion erfolgte mit dem Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce) im Molecular-Imager-Chemidoc-XRS (BioRad) sowie in der Dunkelkammer durch Belichtung eines Röntgenfilms (Hyperfilm, Amersham).

Quantifizierung:

Die quantitative Auswertung der Signale im Westernblot erfolgte mit Hilfe der Software Quantity One von BioRad. GAPDH fungierte hier als Housekeeping-Protein. Zur Normalisierung der Daten wurde zunächst die Ratio aus den gegen den Hintergrund normalisierten „Adjusted Volume INT*mm²“ von Androgenrezeptor und GAPDH gebildet.

2.3.6 RNA-Analyse

2.3.6.1 Gesamt-RNA-Isolierung aus Monolayerkulturen

Die Gesamt-RNA-Isolierung aus den Fibroblasten erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen.

Die für die Gesamt-RNA-Isolierung angezüchteten Zellen wurden zweimal mit 3 ml PBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 600 µl RLT-Puffer supplementiert, mit 1 % 2-Mercaptoethanol der Firma Merck lysiert und mit einem Zellschaber von dem Flaschenboden gelöst. Das Lysat wurde in eine Qias shredder-Säule pipettiert und 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Zu dem sich nun im Auffangröhrchen befindenden Lysat wurden 600 µl 70 %-iges Ethanol hinzugefügt und durch Pipettieren mit diesem vermischt. Das entstandene Gemisch wurde dann in eine RNeasy Säule pipettiert und für 15 Sekunden mit 10.000 rpm zentrifugiert. Die auf der Säule gebundene RNA wurde mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen und erneut bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Daraufhin erfolgte die Hinzugabe von 500 µl RPE-Puffer und ein erneuter Zentrifugationsschritt von 15 Sekunden bei 10.000 rpm. Ein weiteres Mal wurden 500 µl RPE-Puffer in die RNeasy Säule pipettiert, diesmal wurde diese bei 13.000 rpm für 2 Minuten trocken zentrifugiert. Die RNeasy Säule wurde nun auf ein neues 1,5 ml Sammelgefäß gesetzt. Zum Eluieren wurden 30 µl zuvor auf 80 °C erhitztes RNase-freies H₂O dazu pipettiert und für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde noch einmal mit 30 µl auf 80 °C erhitzten RNase-freiem H₂O wiederholt. In den insgesamt gewonnenen 60 µl H₂O befand sich die Gesamt-RNA der Zellen, die photometrisch gemessen und dann bei -80 °C eingefroren wurde.

2.3.6.2 Gesamt-RNA-Isolierung aus Integra®-Matrix-Kulturen

Zu Beginn wurde das Medium aus den 48-well Platten abgesaugt. Die Matrixstücke wurden mit einer Pinzette aus den wells genommen und in einer Petrischale mit PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden sie auf einer Kompresse vom PBS-Puffer befreit. Dies erfolgte zweimal. Daraufhin wurden die Integra®-Matrix-Stücke in einer zweiten Petrischale mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten, die in ein mit 600 µl RLT-Puffer und 1 % 2-Mercaptoethanol befülltes Eppendorfgefäße gegeben wurden. Das Gemisch wurde kurz gevortext und dann in eine Qiashredder-Säule pipettiert, die 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Alle weiteren Schritte entsprachen der Gesamt-RNA-Isolierung aus den Monolayerkulturen wie oben beschrieben.

2.3.6.3 Gesamt-RNA-Messung

Die Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration wurde fluorometrisch durchgeführt. Dazu wurde 1 µl Gesamt-RNA in einer Verdünnung von 1:100 (RNA: Tris-EDTA) eingesetzt und mit dem Quant-iT RiboGreen Kit von Invitrogen nach den Herstellerangaben behandelt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte dann mit dem Fluoreszenzphotometer FluoStar OPTIMA von Labtech.

2.3.6.4 Fällern der Gesamt-RNA

Das Fällern der Gesamt-RNA dient zum einen dazu in allen Proben die gleiche Konzentration zu erreichen und zum anderen kann es als weiterer Reinigungsschritt gesehen werden.

Die zuvor mit der niedrigsten Konzentration gemessene Gesamt-RNA-Probe (0,037 µg/µl) gab dabei vor, auf welche Konzentration alle weiteren Proben gebracht werden sollten. Die dabei einzusetzende Probenmenge wurde berechnet.

Es wurde zunächst ein Gemisch aus in H₂O gelöster Gesamt-RNA und 3 M Natriumacetat hergestellt, wobei das Natriumacetat 1/10 der Gesamtmenge ausmachte. Diesem Gemisch wurde das 2,5-fache der Gesamtmenge an 100 %-igem Ethanol hinzugefügt und dieses Gemisch für vier Stunden bei -20 °C gelagert. Danach wurde das Gemisch für 30 Minuten mit 13.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 200 µl Ethanol (80 %) gewaschen. Daraufhin wurde das Gemisch erneut für 15 Minuten mit 13.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet 10

Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Dieses wurde dann in 11 µl Diethylpyrocarbonat-H₂O (DEPC- H₂O) gelöst, was eine Konzentration von 0,037 µg Gesamt-RNA /µl ergab.

2.3.7 Real-Time-PCR

2.3.7.1 Synthese der cDNA

Um die RNA-Mengen quantitativ durch eine Real-Time-PCR bestimmen zu können, musste die gewonnene Gesamt-RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurde das SuperScript II Reverse Transkriptase Kit von Invitrogen verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Es wurde der Thermocycler PTC 200 von MJ Research benutzt. Alle Arbeiten erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, auf Eis.

Zu Beginn wurden 10 µl Gesamt-RNA mit 1 µl random primer vermischt und 5 Minuten bei 70 °C denaturiert. Random primer dienen der Reverse Transkriptase als Startpunkt für die Transkription. Während dessen wurde ein Gemisch aus 4 µl 5x Puffer (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8,3), 2 µl dNTPs (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 µl 0,1 M DTT und 0,25 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) hergestellt. Dieses Gemisch wurde der denaturierten Gesamt-RNA hinzugefügt und das Ganze 2 Minuten auf 37 °C erwärmt. Des Weiteren wurde 1 µl Reverse Transkriptase (40 U) hinzugegeben und das Gemisch für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit entstand die gewünschte cDNA. Die entstandene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.7.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion dient der Amplifikation beliebiger DNA-Abschnitte. Für ihre Durchführung werden zwei spezifische Oligonukleotide (Primer) benötigt, die mit jeweils einem Strang der Proben-DNA an den Enden des zu amplifizierenden Abschnittes hybridisieren. Des Weiteren werden die vier Desoxynukleosidtriphosphate in ausreichender Menge sowie eine hitzestabile DNA-spezifische Polymerase (Taq-Polymerase) benötigt.

Zunächst erfolgt die Denaturierung der DNA bei 95 °C, das heißt, dass die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge zerfällt. Daraufhin kann die eigentliche Amplifikation stattfinden. Nach dem Abkühlen auf 60 °C lagern sich die beiden Primer an die Einzelstränge an (Annealing). Von ihnen aus erfolgt dann die Synthese eines komplementären Stranges

durch die Taq-Polymerase bei einer Temperatur von 72 °C (Extension). Dieser Vorgang wird ca. 40-mal wiederholt, wobei sich unter idealen Bedingungen die Anzahl der zu amplifizierenden DNA-Abschnitte jedes Mal verdoppelt.

2.3.7.3 Real-Time-PCR

Mit Hilfe der Real-Time-PCR sollte die Expression bestimmter Gene untersucht werden, in diesem Fall von IGFBP2, ApoD, AR und GAPDH. Hierbei fungierte GAPDH als Housekeeping-Gen. IGFBP2, ApoD und AR waren die sogenannten Zielgene. Für die Real-Time-PCR wurde der Light Cycler 2 von Roche genutzt.

Prinzip:

Grundsätzlich erfolgt eine Vervielfältigung der DNA im Sinne einer normalen PCR, die aber zusätzlich die Quantifizierung der amplifizierten Gene zulässt. Zur Quantifizierung werden Fluoreszenzen der Sonden-markierter PCR-Produkte gemessen, die mit der Menge der PCR-Produkte korrelieren und im Verlauf der PCR zunehmen. Hierbei erfolgt die Messung in der sogenannten Log-Linear-Phase, die der exponentiellen Phase der PCR entspricht, da man in dieser Phase davon ausgehen kann, dass die Amplifikationseffizienz in den einzelnen Proben konstant ist. Als fluoreszenzgebende Farbstoffe werden unter anderem UniversalProbelibrary-Sonden genutzt. Diese sind Hydrolyse-Sonden, die eine Länge von 8 bis 9 bp und so genannte Locked Nucleic Acids besitzen. Die Locked Nucleic Acids sind chemisch modifizierte Nucleinsäuren, die deutlich höhere Schmelztemperaturen als normale Nucleinsäuren zulassen. Diese Sonden sind komplementär zu einem Bereich, der zwischen den beiden Primerbindungsstellen des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes liegt. Sie sind am 5'-Ende mit dem Fluorophor Fluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit einem Dark Quencher Dye markiert. Dieser Quencher unterdrückt die Reporterfluoreszenz bei intakter Sonde. Während des PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde zunächst mit dem komplementären Einzelstrang, wird dann durch die 5',3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert, so dass Fluorescein und Quencher voneinander getrennt werden. Hierdurch wird die Fluoreszenz des freien Farbstoffs nicht mehr unterdrückt und kann von Detektoren gemessen werden. Die optische Einheit des Light Cycler enthält drei Detektionskanäle, die Fluoreszenz der Wellenlängen 530 nm, 640 nm und 710 nm messen. Diese übermitteln die gemessenen Daten nach jedem Zyklus an einen Computer, so dass man den Prozess der Real-Time-PCR direkt verfolgen kann. Abhängig von der Ausgangskonzentration des zu

amplifizierenden DNA-Abschnittes tritt die gemessene Fluoreszenz zu einem bestimmten Zeitpunkt aus dem Hintergrund hervor. Dieser Zeitpunkt wird beim Light Cycler als Crossing Point (CP) bezeichnet. Der CP-Wert steht somit in direktem Zusammenhang mit der Ausgangskonzentration des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Verdünnt man eine Probe um das Zehnfache sollte es unter optimalen Bedingungen zu einem Unterschied zwischen den CP der Ausgangsprobe und der verdünnten Probe von 3,3 Zyklen kommen.

Durchführung:

Die Real-Time-PCR wurde für die oben genannten Gene durchgeführt. Neben den Proben wurden bei jedem Lauf zusätzlich eine Referenz-cDNA und H₂O als Negativprobe untersucht.

Es wurde der TaqMan Mastermix von Roche genutzt. Dem Reaktionsmix wurde kurz vor Gebrauch die FastStart Taq DNA Polymerase hinzugefügt, der nun als Mastermix bezeichnet wurde. Daraufhin wurde ein Mix aus 12 µl H₂O, je 1 µl Sense- und Antisense-Primer mit einer Konzentration von 4 pmol/µl, 0,2 µl der entsprechenden UniversalProbeLibrary(UPL)-Sonde und 4 µl TaqMan Mastermix pro Probe hergestellt. Die Light Cycler Kapillaren wurden in den gekühlten Adapter gestellt und in je eine Kapillare 18 µl des Mixes sowie 2 µl der 1:10 verdünnten DNA-Proben bzw. 2 µl der 1:10 verdünnten Referenz-cDNA oder 2 µl Wasser pipettiert. Die Kapillaren wurden verschlossen und bei 2000 rpm 20 Sekunden zentrifugiert, um die gesamte Flüssigkeit in den Schaft der Kapillaren zu befördern. Sie wurden dann in den Light Cycler überführt und die Real-Time-PCR wie oben beschrieben gestartet. Es wurden 45 Amplifikationszyklen durchlaufen. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung pro PCR-Lauf durchgeführt. Die genauen Primer- und SONDENSEQUENZEN können der Tabelle im Anhang entnommen werden.

Auswertung:

Housekeeping-Gen:

Housekeeping-Gene sind konstitutionelle Gene, die Proteine der basalen Zellfunktionen humaner Zellen kodieren und geringen Expressionsschwankungen durch äußere Einflussfaktoren unterliegen. Aufgrund dieser Charakteristik eignen sich diese Gene bei der relativen Quantifizierung zur Normalisierung der Zielgen-Expression, die als Ratio Zielgen/Housekeeping-Gen in die weitere Quantifizierung eingeht.

In diesem Falle wurde GAPDH als Housekeeping-Gen genutzt. GAPDH (Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase) ist ein Enzym der Glykolyse, das die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert. Es kommt ubiquitär in humanen Zellen vor und wird häufig als Housekeeping-Gen genutzt.

Relative Quantifizierung:

Für die Auswertung wurden zunächst Standardkurven der zu amplifizierenden DNA-Abschnitte erstellt. Dabei wurde eine Verdünnungsreihe einer Referenz-cDNA von 1:1 bis 1:1000 hergestellt und eine RT-PCR mit ihr durchgeführt. Die Referenz-cDNA wurde aus einer kommerziell erhältliche „Universal Reference RNA“ von Stratagene, die aus der gepoolten Gesamt-RNA von zehn unterschiedlichen menschlichen Zelllinien besteht, bereits für andere Projekte der Arbeitsgruppe hergestellt und etabliert. Für jede Zielgen-Standardkurve und für die Housekeeping-Gen-Standardkurve wurde ein Koeffizient-File erstellt. Mit diesem wurden alle Ergebnisse der RT-PCR der zu untersuchenden Proben bei der Analyse abgeglichen und somit die PCR-Effizienz in die Auswertung mit einbezogen. Die Quantifizierungsergebnisse wurden dann mit Hilfe des Quantifizierungsprogramms Light Cycler Relative Quantification Software direkt errechnet. Die bei jedem PCR-Lauf mitgelaufene Referenz-cDNA fungierte als interne Kontrolle und wurde zur Normalisierung der Proben genutzt. Die Normalisierung mit der Referenz-cDNA sowie der Abgleich mit den Standardkurven als Effizienzkorrektur wurden durch die Software errechnet und als Ratio Probe (Zielgen/Housekeeping-Gen) zu Referenz-cDNA (Zielgen/Housekeeping-Gen) dargestellt.

Überprüfung der RT-PCR-Produkte:

Vor Beginn der eigentlichen Proben-RT-PCR-Läufe wurde eine Überprüfung der RT-PCR-Produkte durchgeführt. Dabei sollte sichergestellt werden, dass wirklich der zu amplifizierenden DNA-Abschnitt transkribiert wurde und keine Nebenprodukte entstanden waren. Dazu wurden die bei der Erstellung der Standardkurven entstandenen RT-PCR-Produkte mit LB III- Puffer (30 % Glycerol, 0,25 % Bromphenolblau) vermischt und auf ein 2 %-iges Agarosegel (2 g Agarose, 100 ml TBE Puffer) aufgetragen. Als Negativkontrolle fungierte das schon bei der RT-PCR als Negativkontrolle mitlaufende H₂O. Zudem wurde ein 100 bp Marker zur Bestimmung der Länge der RT-PCR-Produkte aufgetragen. Das Gel befand sich in einer Elektrophoresekammer, die mit 1x TBE Puffer (0,09 M Tris, 0,09 M

Borsäure, 2,5 mM Na₂-EDTA, pH 7,4) befüllt war. An das Gel wurde für ca. eine Stunde eine Spannung von 100 Volt angelegt. Daraufhin erfolgte für ca. 15 Minuten ein Bad in einer Ethidiumbromidfärbelösung (2 µg/ml). Die dadurch sichtbar gemachten Banden wurden dann mit einer UV-Kamera aufgenommen.

2.3.8 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten zum Nachweis des Androgenrezeptors auf Protein- und RNA-Ebene sowie der RT-PCR-Untersuchungen der beiden potenziellen Androgen-responsiven Gene Apolipoprotein D und Insulin-like growth factor binding protein 2 wurden für jede Versuchsgruppe tabellarisch dargestellt und der Median, das 25 %- und 75 %-Quantil sowie das Minimum und Maximum bestimmt. Da es sich bei den erhobenen Daten um abhängige Stichproben handelte, wurde zur weiteren statistischen Auswertung ein Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt. Dieser hat den Vorteil, dass er robust gegenüber Ausreißern ist. Alle statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag aufgrund von multiplen Testen bei 0,31 %. Die durchgeführten Analysen haben einen explorativen Charakter.

Für die statistische Auswertung wurde mit der SPSS-Software von IBM, Version 29.0.0.0 eine etablierte Software für statistische Analysen genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumsversuche

Um das Wachstumsverhalten von Vorhautfibroblasten in einer dreidimensionalen Matrix zu untersuchen, wurden Vorhautfibroblasten von 2 verschiedenen Individuen zunächst als Monolayerkultur angezogen. 0,5 cm² große Stücke einer Integra[®]-Matrix wurden dann mit 160.000 Zellen einer subkonfluenten Kultur besiedelt (320.000 Zellen/cm²) und in einer 24-well Platte in Anwesenheit oder Abwesenheit von DHT unter täglichem Mediumwechsel kultiviert. Nach 2, 5, 8, 11 und 14 Tagen wurde je eine Probe entnommen, das Gesamtprotein sowie die Gesamt-RNA isoliert und ein MTT-Reduktions-Assay durchgeführt. Somit wurden pro Versuchstag jeweils 2 Integra[®]-Matrix-Kulturen (+/- DHT) pro Individuum, insgesamt also 4 Proben, auf die jeweiligen Parameter untersucht (Abbildung 6 - 8). Hierbei zeigte sich, dass die Menge an Protein bei allen vier Proben zunahm. Bei einer Probe kam es zu einer Zunahme bis Tag 8. Bei zwei der vier Proben kam es zu einer Zunahme der Proteinmenge bis Tag 11. Bei einer der Proben zeigte sich eine geringe Abnahme der Proteinmenge an Tag 5, die dann aber bis Tag 14 kontinuierlich anstieg, so dass auch hier von einer grundsätzlichen Zunahme über die Untersuchungszeit auszugehen war. Die RNA-Menge nahm bei allen 4 Proben bis Tag 5 zu, bei zwei der vier Proben sogar bis Tag 8. Die MTT-Reduktions-Assays wiesen eine Zunahme an metabolisch aktiven und somit viablen Zellen in der Integra[®]-Matrix bis Tag 5 bei allen Proben nach. Bei zwei der vier Proben nahm die Menge der metabolisch aktiven Zellen bis Tag 8 zu.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Vorhautfibroblasten grundsätzlich in einer Integra[®]-Matrix wachsen und sich vermehren können. Ein sicheres Wachstum bestand bis Tag 5, da bis zu diesem Zeitpunkt bei allen drei gemessenen Parametern eine Zunahme gesehen wurde.

Für die sich anschließenden vergleichenden Versuche von Integra[®]-Matrix- und Monolayerkulturen mit und ohne Zusatz von DHT wurde daher der Zeitpunkt Tag 5 ausgewählt, da sie an sich noch im Wachstum befindenden Zellen erfolgen sollten.

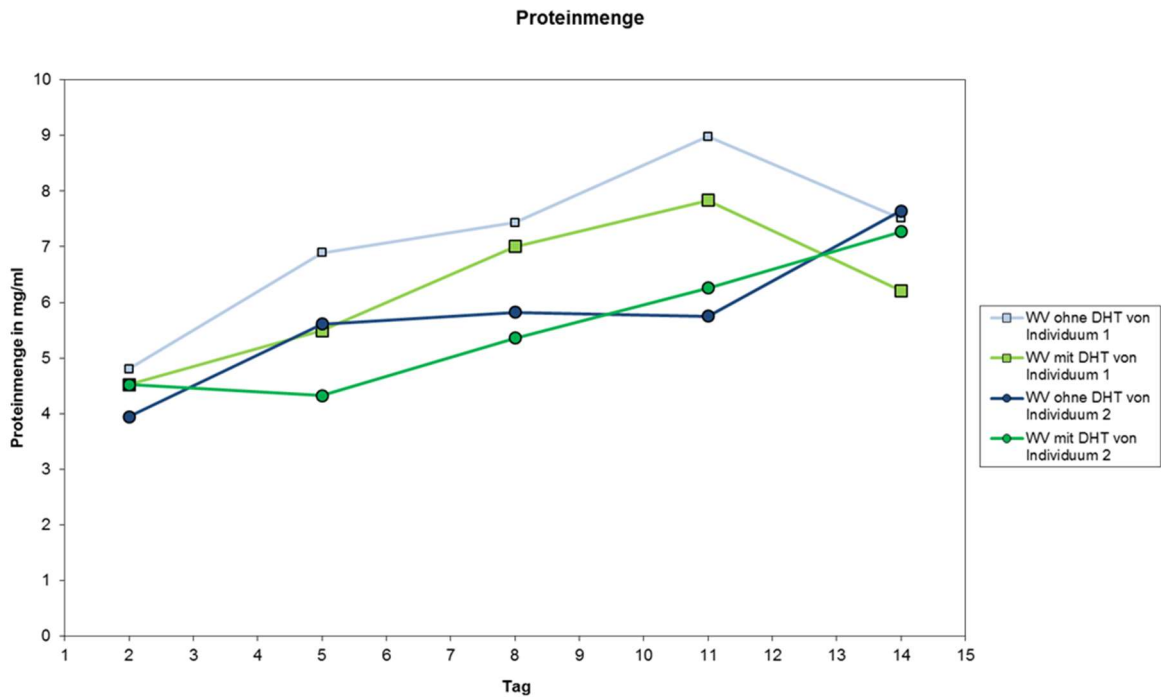


Abbildung 6: Darstellung der aus Integra®-Matrix-Kulturen isolierten Proteinmenge beider Individuen jeweils ohne und mit DHT-Zusatz im Kulturmedium zu den Zeitpunkten Tag 2, 5, 8, 11 und 14, die photometrisch mit dem BioRad Protein Assay nach der Microassay Methode bestimmt wurde

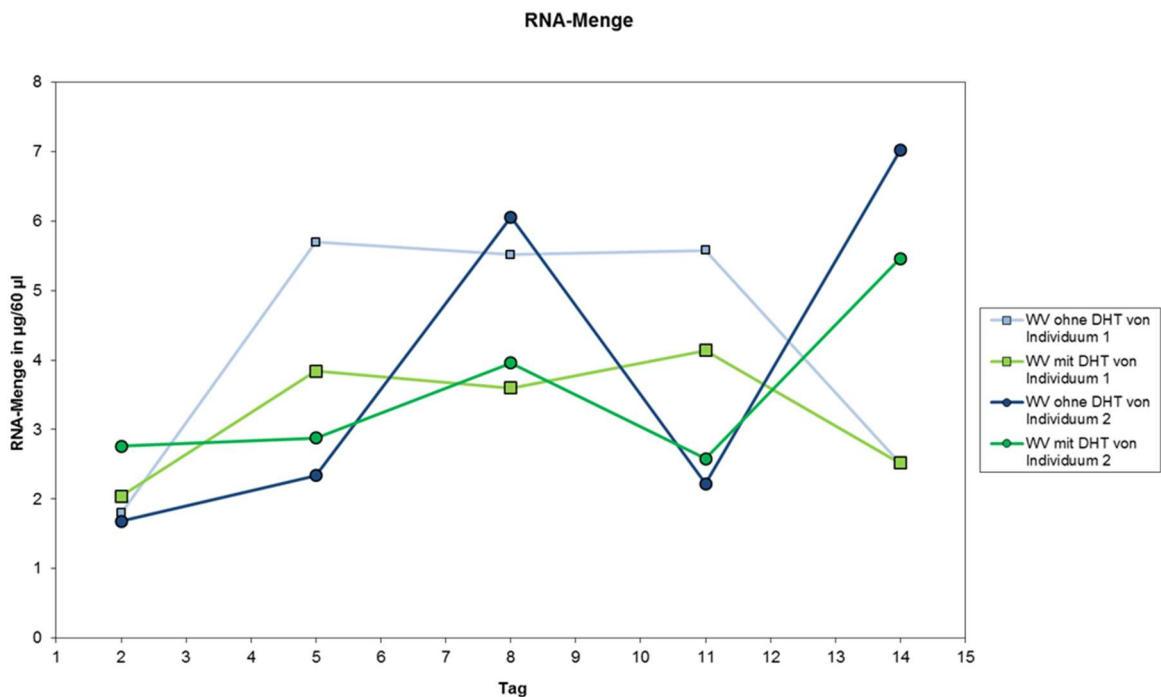


Abbildung 7: Darstellung der aus Integra®-Matrix-Kulturen isolierten RNA-Menge beider Individuen jeweils ohne und mit DHT-Zusatz im Kulturmedium zu den Zeitpunkten Tag 2, 5, 8, 11 und 14, die photometrisch mit dem FluoStar OPTIMA Photometer von Labtech bestimmt wurde

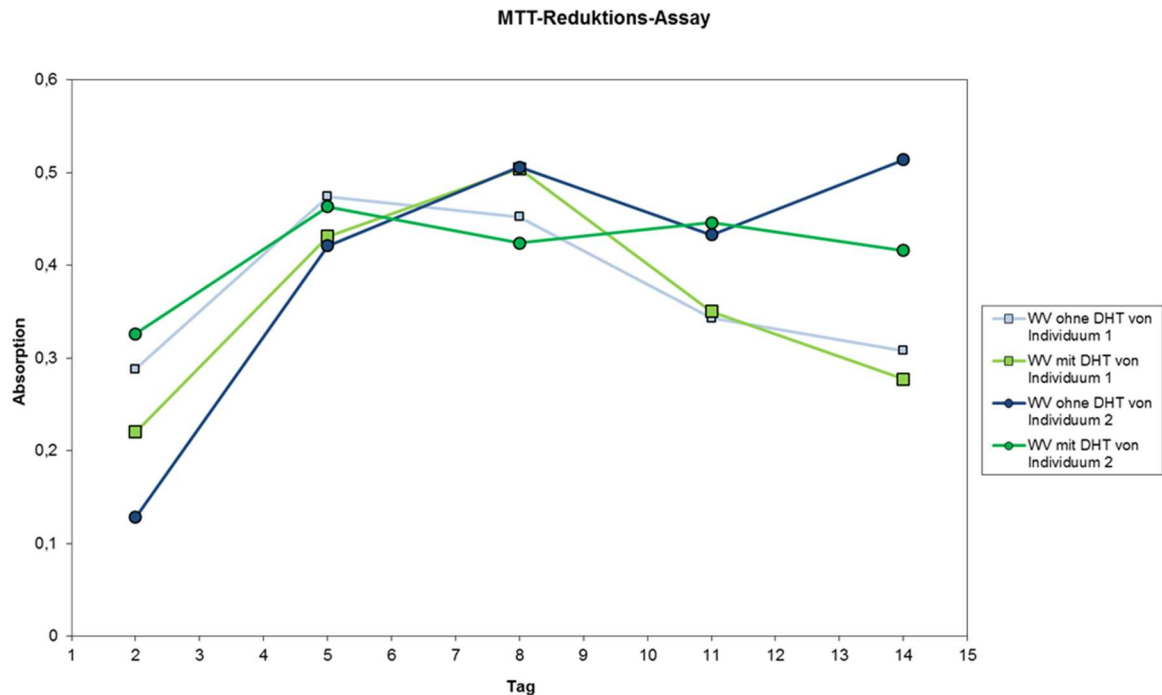


Abbildung 8: Darstellung der Lichtabsorption bei 570 nm durch das von vitalen Vorhautfibroblasten der Integra®-Matrix-Kulturen gebildete Formazan, die photometrisch mit dem BioPhotometer von Eppendorf bestimmt wurde. Die Stärke der Lichtabsorption korreliert hier mit der Menge viabler Zellen. Es wurden Proben beider Individuen jeweils ohne und mit DHT-Zusatz im Kulturmedium zu den Zeitpunkten Tag 2, 5, 8, 11 und 14 untersucht.

3.2 Vergleich von Integra®-Matrix-Kultur mit Monolayerkultur, beide mit und ohne Zusatz von DHT

Es wurde im Anschluss an die Wachstumsversuche eine Versuchsreihe, die zum einen den Vergleich von Integra®-Matrix-Kultur zu Monolayerkultur und zum anderen den Einfluss von DHT-Zusatz im Nährmedium (DMEM-Medium + DCC-FCS) auf die Vorhautfibroblasten untersuchen sollte, durchgeführt.

Hierfür wurden Vorhautfibroblasten der vierten Passage von jedem der 11 Probanden unter folgenden Kulturbedingungen weitergezüchtet:

- Besiedlung von 3 Integra®-Stücken (Durchmesser 8 mm) mit je 160.000 Zellen ohne DHT
- Besiedlung von 3 Integra®-Stücken (Durchmesser 8 mm) mit je 160.000 Zellen mit 10 nM DHT
- Besiedlung von 2 Kulturflaschen (25 cm²) mit je 160.000 Zellen ohne DHT

- Besiedlung von 2 Kulturflaschen (25 cm²) mit je 160.000 Zellen mit 10 nM DHT
- Besiedlung von 1 Chamber Slides mit je 5000 Zellen/Kammer ohne DHT
- Besiedlung von 1 Chamber Slides mit je 5000 Zellen/Kammer mit 10 nM DHT

An Tag 5 der Kultivierung erfolgte die Protein- und RNA-Isolierung sowie die Fixierung der Zellen für die immunhistologische Färbung.

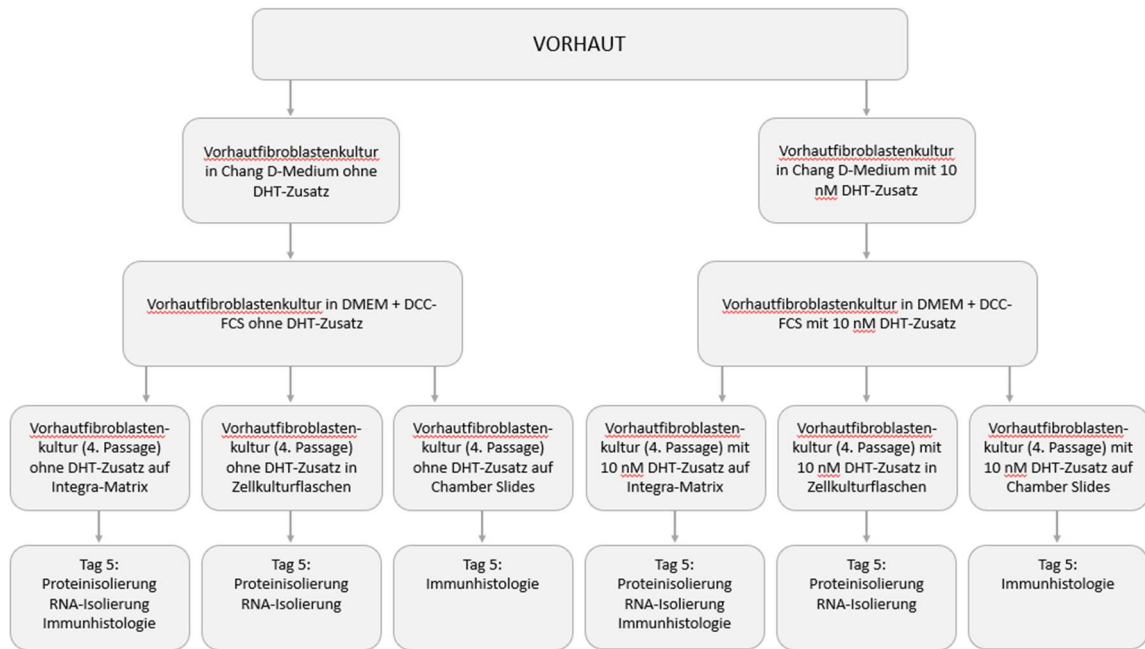


Abbildung 9: Aufteilung der Vorhautfibroblastenkulturen in die einzelnen Versuchsgruppen

3.3 Nachweis des Androgenrezeptors

In den folgenden Versuchen wurden die Lokalisation und die Expression des Androgenrezeptors auf Protein- und RNA-Ebene bei den unterschiedlichen Vorhautfibroblastenkulturen untersucht. Gesunde Vorhautfibroblasten exprimieren Androgenrezeptoren, über deren Aktivierung die Expression Androgen-responsiver Gene gesteuert wird. Die Lokalisation und die Expression des Androgenrezeptors sind abhängig von Faktoren wie z.B. Androgenen, die auf die Zelle einwirken. Die Frage, die hier beantwortet werden sollte, ist, wie die unterschiedlichen Kulturbedingungen die Androgenrezeptorlokalisierung und -expression beeinflussen und ob es Unterschiede zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen gibt, die sich ggf. auf die Expression Androgen-responsiver Gene auswirken könnten.

3.3.1 Nachweis des Androgenrezeptors mittels immunhistologischer Färbung

Die immunhistologische Färbung führte durch eine von der alkalischen Phosphatase katalysierten Reaktion zur Rotfärbung an den Stellen, an denen sich der Androgenrezeptor in den Zellen befand. Zur Etablierung der Färbung wurden initial die stark Androgenrezeptor-positiven LNCaP-Zellen genutzt. Diese wurden ebenfalls mit und ohne DHT-Zusatz angezüchtet. Abbildung 10 A zeigt ein Beispiel für das Ergebnis der Färbung von LNCaP-Zellen, die ohne DHT-Zusatz angezüchtet wurden. Es fand sich eine bläuliche Färbung des Zytoplasmas mit einzelnen rötlichen Punkten, der Zellkern stellte sich ebenfalls bläulich, bei einigen Zellen aber auch violett dar. Wie in Abbildung 10 B gezeigt, waren im Vergleich dazu die Zellkerne der mit DHT-Zusatz angezüchteten LNCaP-Zellen rot. Hier erschien das Zytoplasma im Vergleich insgesamt blässer und rötlicher. Leider war auch der Hintergrund heller und röter, was eine Quantifizierung schwierig machte. Nichtsdestotrotz konnte demonstriert werden, dass eine vermehrte Rotfärbung und damit mehr Androgenrezeptor bei den LNCaP-Zellen, die mit DHT-Zusatz angezüchtet wurden, vorlag. Lokalisiert war der Androgenrezeptor bei beiden Kulturbedingungen bevorzugt im Zellkern. Bei den LNCaP-Zellen, die ohne DHT-Zusatz angezüchtet wurden, bestand zudem eine vermehrte Rotfärbung des Zytoplasmas, was dafürsprach, dass der Androgenrezeptor auch im Zytoplasma lokalisierbar war (Abbildung 10 A-B).

Nach der Etablierung der entsprechenden Kulturen wurden auch die Vorhautfibroblasten der Chamber Slide Kulturen und Integra[®]-Matrix-Kulturen jeweils mit und ohne Zusatz von 10 nM DHT der 11 Probanden an Tag 5 gefärbt. Die Färbung der Vorhautfibroblasten aus Chamber Slide Kulturen stellte sich jedoch schwierig dar. Es zeigte sich nur eine geringe Rotfärbung im Zytoplasma bei den Vorhautfibroblasten, die ohne DHT-Zusatz angezüchtet wurden, und eine etwas vermehrte bei den Vorhautfibroblasten, die mit DHT-Zusatz angezüchtet wurden. Auch hier wirkte es so, dass eine vermehrte Lokalisation des Androgenrezeptors im Zellkern bei den mit DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten bestand. Leider war aber auch hier die Hintergrundfärbung bei den ohne DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten insgesamt dunkler und somit auch hier eine quantitative Aussage nicht zu treffen. Zudem schienen die Vorhautfibroblasten unter DHT-Zusatz ihre Morphologie zu ändern. So lagen die mit DHT-Zusatz angezüchteten

Vorhautfibroblasten dichter beieinander und waren runder im Vergleich zu den Vorhautfibroblasten, die ohne DHT-Zusatz angezüchtet wurden (Abbildung 10 C-D).

Bei den Schnitten der Integra®-Matrix-Kulturen waren die Kollagenfasern der Integra®-Matrix sowie die Vorhautfibroblasten, die sich in dem dreidimensionalen Kollagengerüst angeordnet hatten, zu erkennen. Eine genaue Abgrenzung zwischen Vorhautfibroblasten und Kollagenfasern stellte sich jedoch schwierig dar. So war das Zytoplasma bei beiden Versuchsgruppen schwer zu identifizieren und vor allem der Zellkern erkennbar. Auch hier erschien die Hintergrundfärbung bei den ohne DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten dunkler. Trotzdem wirkten die Zellkerne der mit DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten rötlicher als die der ohne DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten. Dies könnte für eine vermehrte Lokalisation des Androgenrezeptors im Zellkern der mit DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten sprechen (Abbildung 10 E-F).

In Zusammenschau konnte sich der Fragestellung durch die Immunhistologie nur angenähert werden. Die Zellmorphologien der einzelnen Versuchszellen wirkten zu unterschiedlich und die Färbung selbst war zu schwach, um eindeutig interpretiert werden zu können. Eine Quantifizierung war nicht möglich. So blieben zu viele Unsicherheiten für eine sichere Aussage über den Nachweis des Androgenrezeptors, seiner Menge und seiner Lokalisation. Daher musste dieser auf anderem Wege nachgewiesen werden, was durch die nachfolgenden Untersuchungen mittels Westernblot und RT-PCR auf Protein- und RNA-Ebene erfolgte.

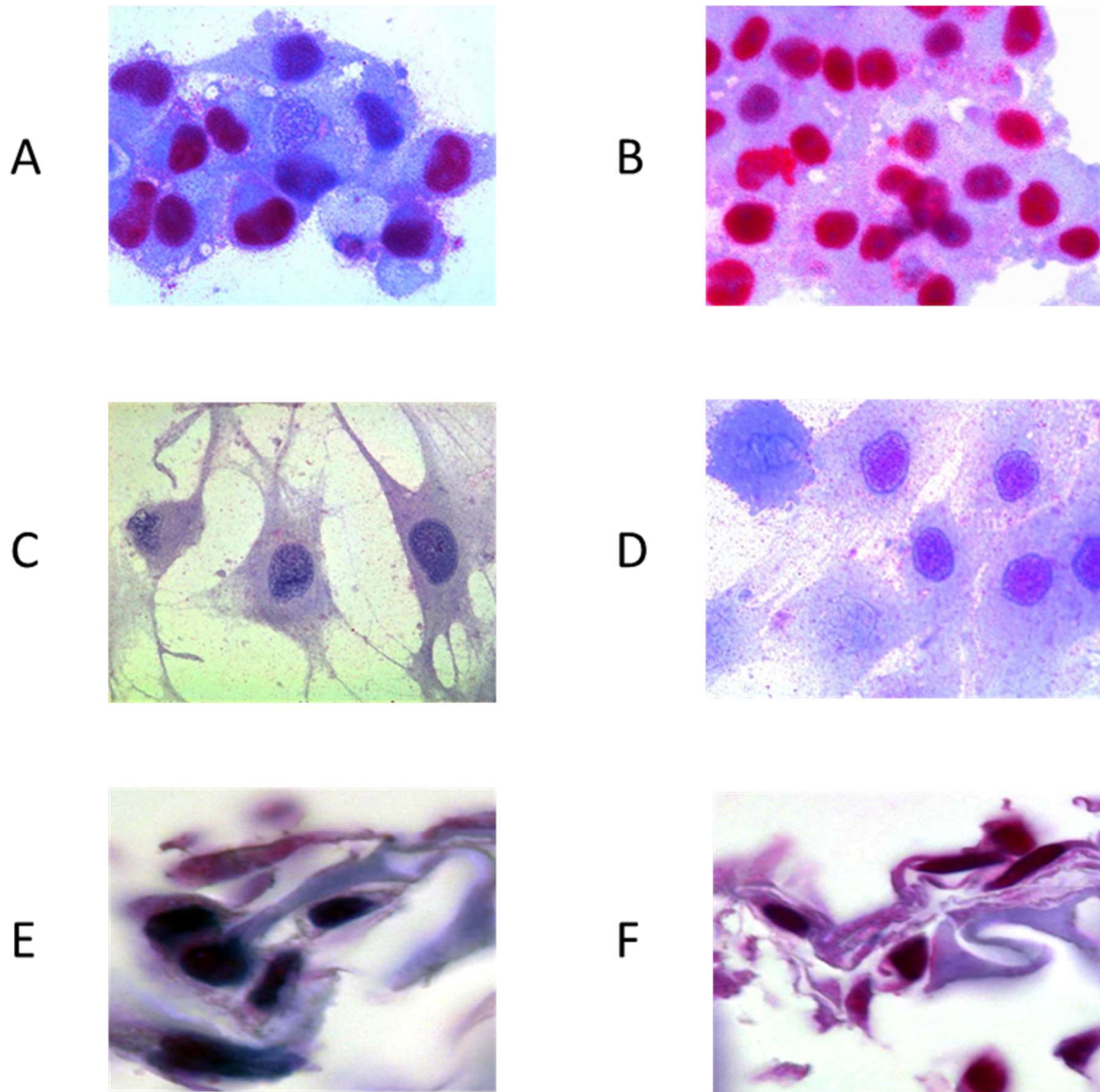


Abbildung 10: Exemplarische Abbildung der immunhistologischen Färbung des Androgenrezeptors aller untersuchter Zellreihen und Kulturbedingungen (630-fache Vergrößerung): Abbildung der untersuchten Zellen mit dem dunkel angefärbten Zellkern. Die Rotfärbung entspricht dem Nachweis des Androgenrezeptors. Zusätzlich sieht man bei den Integra®-Matrix-Kultur-Färbungen Teile des Matrixgerüsts, in dem die Zellen wachsen.

- A: LNCaP-Zellen in Chamber Slide Kulturen an Tag 5, ohne DHT angezchtet
- B: LNCaP-Zellen in Chamber Slide Kulturen an Tag 5, mit DHT angezchtet
- C: Vorhautfibroblasten in Chamber Slide Kulturen an Tag 5, ohne DHT angezchtet
- D: Vorhautfibroblasten in Chamber Slide Kultur an Tag 5, mit DHT angezchtet
- E: Vorhautfibroblasten in Integra®-Matrix-Kultur an Tag 5, ohne DHT angezchtet
- F: Vorhautfibroblasten in Integra®-Matrix-Kultur an Tag 5, mit DHT angezchtet

3.3.2 Nachweis des Androgenrezeptorproteins mittels Westernblot

Um die relative Expression des Androgenrezeptors in Monolayer- und Integra®-Matrix-Kulturen mit und ohne DHT-Zusatz auf Proteinebene zu vergleichen, wurden Westernblots der Proteinisolate aus den jeweiligen Kulturen aller 11 Probanden durchgeführt. GAPDH fungierte hier als Housekeeping-Protein.

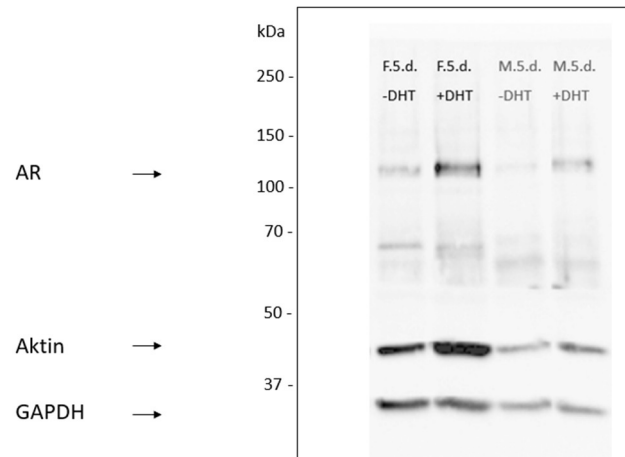


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung eines Westernblots der Proben eines Probandens (F: Flasche, M: Matrix, +/- DHT) an Tag 5. Die obere Bande entspricht dem Androgenrezeptor (AR), die untere Bande GAPDH.

In die Auswertung flossen die Ergebnisse der Proben aller 11 phänotypisch männlichen Probanden im Alter von ein bis zehn Jahren ein. Die Vorhautfibroblasten aller Versuchsgruppen wiesen den Androgenrezeptor auf. Die deskriptiven Ergebnisse sind in Tabelle 2 zu finden. Es war bei allen 11 Probanden der Androgenrezeptor bei den Vorhautfibroblasten, die mit DHT-Zusatz angezüchtet wurden, sowohl in den Flaschen- als auch in den Integra[®]-Matrix-Kulturen vermehrt nachweisbar. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Flaschen- und Integra[®]-Matrix-Kulturen mit DHT-Zusatz im Vergleich zu den Flaschen- und Integra[®]-Matrix-Kulturen ohne DHT-Zusatz gezeigt werden (siehe Tabelle 3). Der entsprechende Median lag bei den mit DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten über dem der Vorhautfibroblasten ohne Zusatz von DHT (siehe Tabelle 2).

Ein Unterschied zwischen Flaschen- und Integra[®]-Matrix-Kulturen konnte hingegen nicht gezeigt werden.

	Flasche - DHT	Flasche + DHT	Matrix - DHT	Matrix + DHT
Proband 1	1,558	4,6004	0,0752	0,74
Proband 2	1,0615	3,79	0,6965	3,9402
Proband 3	0,8414	2,5263	0,4202	1,1721
Proband 4	0,5692	1,2243	0,1817	0,6414
Proband 5	0,2109	0,9377	0,1319	0,66
Proband 6	0,6669	1,2218	0,693	1,1686
Proband 7	0,6506	0,9413	0,429	2,0479
Proband 8	0,7637	1,2399	0,5948	1,3915
Proband 9	0,4876	0,7874	0,2764	0,5773
Proband 10	0,6338	0,9194	0,9498	1,8992
Proband 11	0,5116	1,1417	0,5038	2,395
Median	0,6506	1,2218	0,429	1,1721
25 %-Quantil	0,5116	0,9377	0,1817	0,66
75 %-Quantil	0,8414	2,5263	0,693	2,0479
Minimum	0,2109	0,7874	0,0752	0,5773
Maximum	1,558	4,6004	0,9498	3,9402

Tabelle 2: Ratio AR/GAPDH der vier unterschiedlichen Kulturbedingungen der Vorhautfibroblasten (Flaschenkultur ohne DHT-Zusatz, Flaschenkultur mit DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur ohne DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur mit DHT-Zusatz) der 11 Probanden an Tag 5

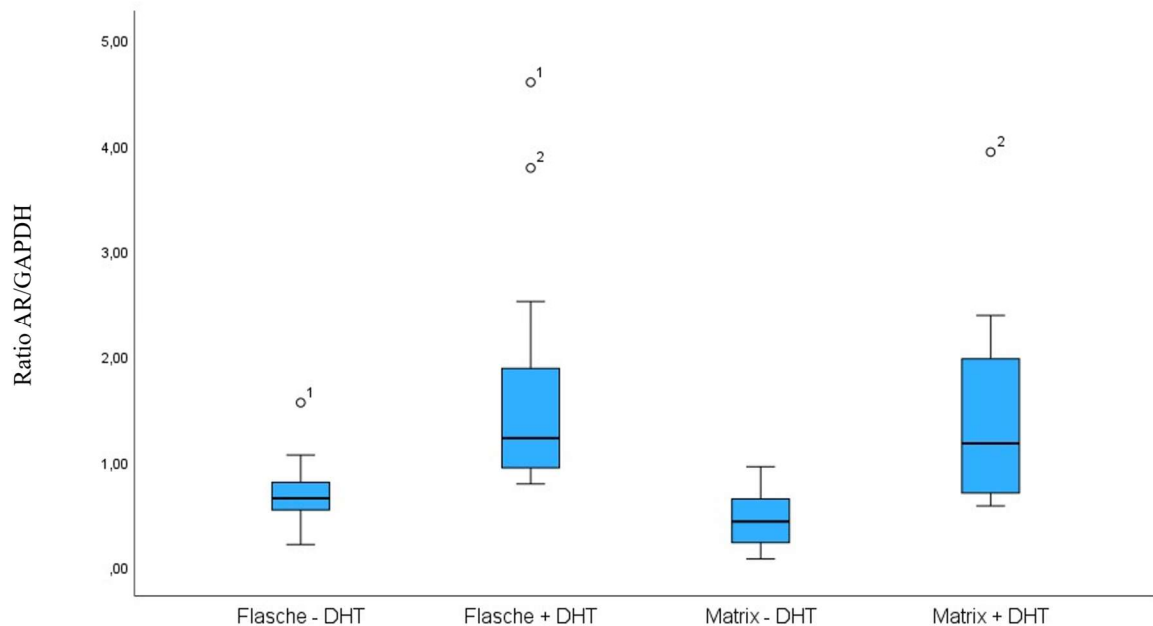


Abbildung 12: Grafische Darstellung der Ratio AR/GAPDH der vier unterschiedlichen Kulturbedingungen der Vorhautfibroblasten (Flaschenkultur ohne DHT-Zusatz, Flaschenkultur mit DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur ohne DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur mit DHT-Zusatz) der 11 Probanden an Tag 5 als Boxplot.

Erläuterung: Zur Veranschaulichung der Daten wurde ein Boxplot erstellt. Hier bilden die Boxen den Bereich zwischen der 25%-Quantil und der 75%-Quantil und zeigen somit an in welchem Bereich sich 50% der erhobenen Werte befinden. Bei den Flaschen- und Integra®-Matrix-Kulturen ohne DHT-Zusatz war die Spannweite, in der sich 50% der erhobenen Werte befanden, kleiner als bei den Kulturen mit DHT-Zusatz. Die als Linie in den Boxen dargestellten Mediane waren bei den Flaschen- und Integra®-Matrix-Kulturen ohne DHT-Zusatz auf einer ähnlichen Höhe. Dies galt auch für die Flaschen- und Integra®-Matrix-Kulturen mit DHT-Zusatz. Die Antennen bilden das Minimum und Maximum der berechneten Ratios ab. Die mit eins und zwei markierten Punkte waren jeweils Ratios von Proband 1 und 2, die als Ausreißer abgebildet wurden.

	Mediandifferenz	Z-Wert	p-Wert
Flasche + DHT – Flasche - DHT	0,5712	-2,934	0,003
Matrix + DHT – Matrix - DHT	0,7431	-2,934	0,003
Matrix - DHT – Flasche - DHT	-0,2216	-2,134	0,033
Matrix + DHT – Flasche + DHT	-0,0497	-0,356	0,722

Tabelle 3: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur vergleichenden Analyse der Ratio AR/GAPDH unter den vier Kulturbedingungen an Tag 5.

Erläuterung: Es bestand ein Unterschied zwischen der Androgenrezeptorproteinmenge bei den Vorhautfibroblasten aus Flaschen- und Integra[®]-Matrix-Kulturen, die mit DHT-Zusatz angezchtet wurden, im Vergleich zu den Vorhautfibroblasten aus Flaschen- und Integra[®]-Matrix-Kulturen, die ohne DHT-Zusatz angezchtet wurden. Unterschiede bei dem Vergleich von Flaschenkultur zu Integra[®]-Matrix-Kultur konnten nicht gefunden werden.

3.3.3 Nachweis der Androgenrezeptor-RNA mittels RT-PCR

Zur relativen Quantifizierung der Androgenrezeptor-RNA als Ratio zum Housekeeping-Gen GAPDH erfolgten die Untersuchungen der RNA-Isolate aller 11 Probanden an Tag 5 aus den jeweiligen Kulturen mittels Light Cycler RT-PCRs.

Bei allen 11 Probanden konnte Androgenrezeptor-RNA unter den vier Kulturbedingungen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 4).

Die Expressionsdaten lagen im Mittel bei den Integra[®]-Matrix-Kulturen etwas höher als bei den Flaschenkulturen (siehe Tabelle 4). Signifikante Unterschiede fanden sich weder in Bezug auf den DHT-Zusatz zum Kulturmedium noch bei dem Vergleich von Flaschen- und Integra[®]-Matrix-Kulturen (siehe Tabelle 5).

	Flasche - DHT	Flasche + DHT	Matrix - DHT	Matrix + DHT
Proband 1	6,87	7,03	12,77	8,31
Proband 2	6,28	6,36	5,67	6,03
Proband 3	4,73	11,23	10,59	9,13
Proband 4	9,37	8,04	3,77	9,26
Proband 5	7,14	11,01	11	11,87
Proband 6	4,42	4,59	5,88	4,35
Proband 7	2,8	5,74	1,63	2,52
Proband 8	3,82	3,86	7,19	8,54
Proband 9	5,27	7,29	9,92	9,29
Proband 10	8,42	7,47	10,72	10,35
Proband 11	10,03	7,31	11,03	10,26
Median	6,28	7,29	9,92	9,13
25 %-Quantil	4,42	5,74	5,67	6,03
75 %-Quantil	8,42	8,04	11	10,26
Minimum	2,8	3,86	1,63	2,52
Maximum	10,03	11,23	12,77	11,87

Tabelle 4: Normalisierte Ratio AR/GAPDH der vier unterschiedlichen Kulturbedingungen der Vorhautfibroblasten (Flaschenkultur ohne DHT-Zusatz, Flaschenkultur mit DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur ohne DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur mit DHT-Zusatz) der 11 Probanden an Tag 5

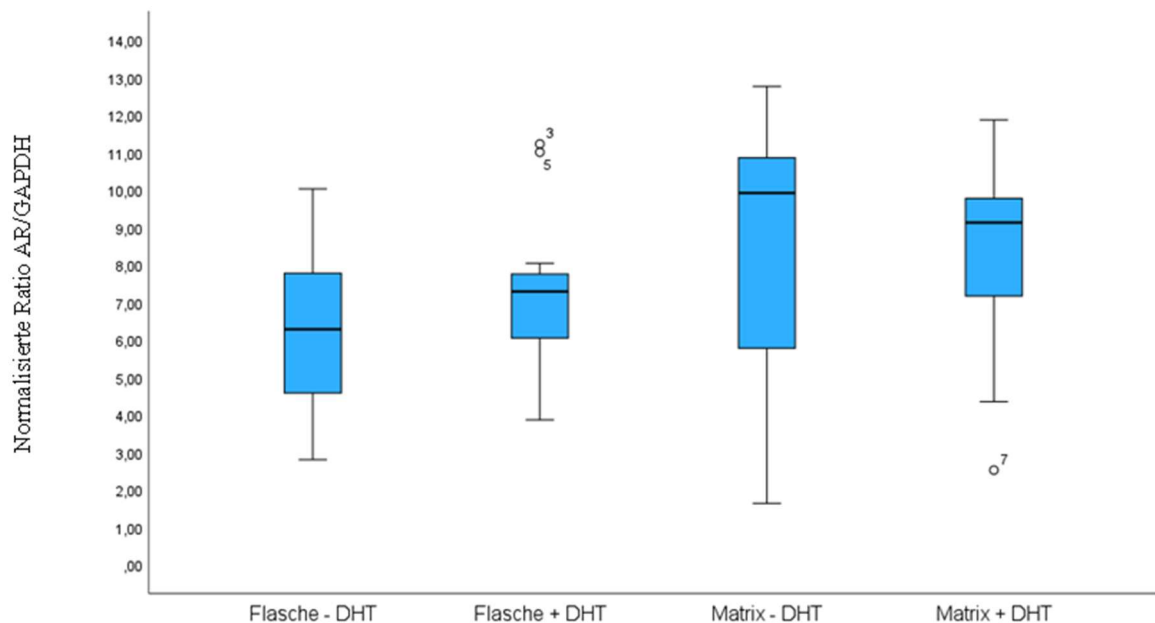


Abbildung 13: Grafische Darstellung der relativen Expressionsdaten der Androgenrezeptor-RNA als normalisierte Ratio AR/GAPDH der vier unterschiedlichen Kulturbedingungen der Vorhautfibroblasten (Flaschenkultur ohne DHT-Zusatz, Flaschenkultur mit DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur ohne DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur mit DHT-Zusatz) der 11 Probanden an Tag 5 als Boxplot

Erläuterung: Der Bereich, in dem sich 50% der erhobenen Werte befanden, war bei allen vier Kulturbedingungen groß, ebenso wie die Spannweite zwischen dem Minimum und Maximum. Die als Linie in den Boxen dargestellten Mediane waren jeweils bei den Flaschenkulturen und den Integra®-Matrix-Kulturen auf einer ähnlichen Höhe. Die mit Punkten markierten Werte der Probanden 3, 5 und 7 waren Ausreißer.

	Mediandifferenz	Z-Wert	p-Wert
Flasche + DHT – Flasche - DHT	1,01	-1,245	0,213
Matrix + DHT – Matrix - DHT	-0,79	-0,267	0,790
Matrix - DHT – Flasche - DHT	3,64	-1,778	0,075
Matrix + DHT – Flasche + DHT	1,84	-1,156	0,248

Tabelle 5: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur Analyse der Expression des Androgenrezeptors normalisiert mit GAPDH unter den vier Kulturbedingungen an Tag 5.

Erläuterung: Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zeigte keine Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturbedingungen.

3.4 Nachweis der potenziell Androgen-responsiven Gene mittels RT-PCR und Vergleich zwischen Monolayer- und Integra®-Matrix-Kulturen

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurden die Gene Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) und Apolipoprotein D (ApoD) als potenzielle Androgen-responsive Gene identifiziert. Mittels Light Cycler RT-PCR sollte diese Annahme am Probandenkollektiv dieser Arbeit überprüft werden. Hierfür wurde die RNA-Expression von IGFBP2 und ApoD bei den Vorhautfibroblasten aus den vorangegangenen Versuchen, also aus Flaschen- und Integra®-Matrix-Kulturen der 11 Probanden, die jeweils mit und ohne DHT-Zusatz angezüchtet wurden, verglichen. Somit wurden zum einen der Einfluss des DHT-Zusatzes im Kulturmedium auf die Genexpression von IGFBP2 und ApoD sowie der Einfluss eines dreidimensionalen Wachstums in der Integra®-Matrix untersucht. Auch hier fungierte GAPDH als Housekeeping-Gen.

3.4.1 Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)

Die Expression von IGFBP2 konnte bei den Vorhautfibroblasten aller 11 Probanden unter allen vier Kulturbedingungen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 6).

Ein Unterschied zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen konnte jedoch nicht gezeigt werden (siehe Tabelle 7). Somit ließ sich IGFBP2 durch diese Versuche nicht als Androgen-responsives Gen bestätigen. Auch ergab sich kein Unterschied bezüglich der Anzucht in einer dreidimensionalen Matrix gegenüber einer Monolayerkultur (siehe Tabelle 7).

	Flasche - DHT	Flasche + DHT	Matrix - DHT	Matrix + DHT
Proband 1	0,27	0,44	0,3	1
Proband 2	0,16	0,04	0,16	0,07
Proband 3	0,31	0,32	0,51	0,64
Proband 4	0,09	0,16	0,54	1,02
Proband 5	1,82	3,04	0,65	1,31
Proband 6	0,19	0,13	0,06	0,24
Proband 7	0,1	0,03	0,03	0,05
Proband 8	1,87	0,63	0,52	0,57
Proband 9	0,5	0,36	2,05	0,62
Proband 10	0,24	2,64	0,27	5,19
Proband 11	0,24	0,41	0,36	1,31
Median	0,24	0,36	0,36	0,64
25 %-Quantil	0,16	0,13	0,16	0,24
75 %-Quantil	0,5	0,63	0,54	1,31
Minimum	0,09	0,03	0,03	0,05
Maximum	1,87	3,04	2,05	5,19

Tabelle 6: Normalisierte Ratio IGFBP2/GAPDH der vier unterschiedlichen Kulturbedingungen der Vorhautfibroblasten (Flaschenkultur ohne DHT-Zusatz, Flaschenkultur mit DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur ohne DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur mit DHT-Zusatz) der 11 Probanden an Tag 5

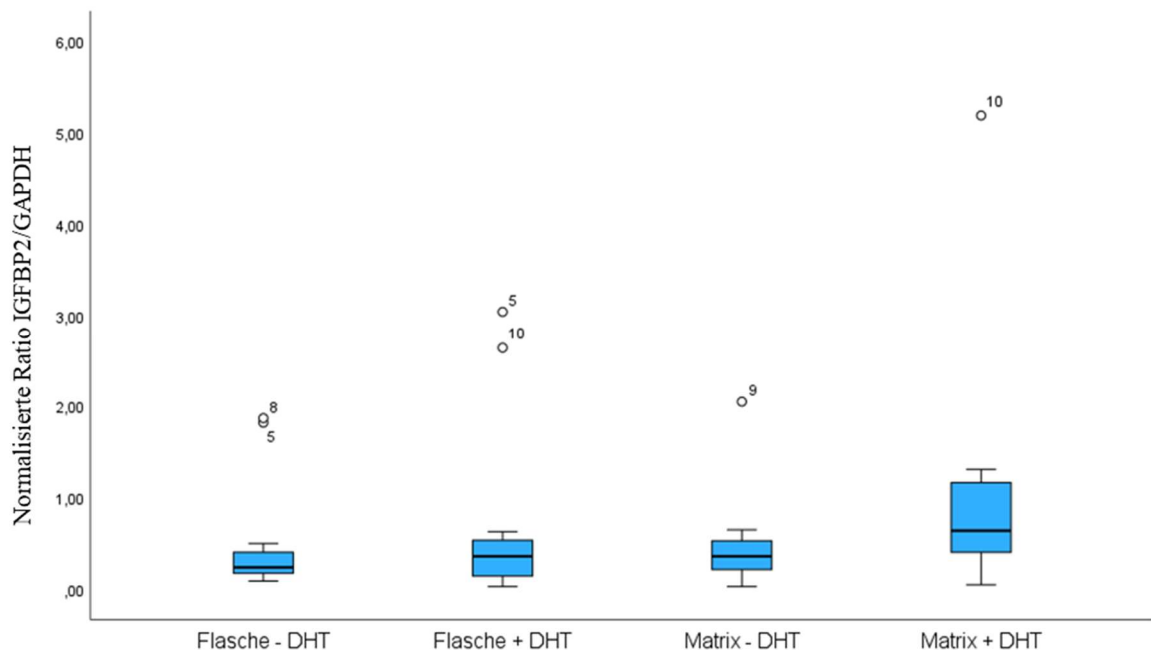


Abbildung 14: Grafische Darstellung der relativen Expressionsdaten der IGFBP2-RNA als normalisierte Ratio IGFBP2/GAPDH der vier unterschiedlichen Kulturbedingungen der Vorhautfibroblasten (Flaschenkultur ohne DHT-Zusatz, Flaschenkultur mit DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur ohne DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur mit DHT-Zusatz) der 11 Probanden an Tag 5 als Boxplot

Erläuterung: Die Spannweite der erhobenen Werte war bei allen Kulturbedingungen klein. Die Mediane lagen nah beieinander. Die mit Punkten markierten Werte der Probanden 5, 8, 9 und 10 waren Ausreißer.

	Mediandifferenz	Z-Wert	p-Wert
Flasche + DHT – Flasche - DHT	0,12	-0,578	0,563
Matrix + DHT – Matrix - DHT	0,28	-1,778	0,075
Matrix - DHT – Flasche - DHT	0,12	-0,255	0,799
Matrix + DHT – Flasche + DHT	0,28	-1,778	0,075

Tabelle 7: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur Analyse der Expression von IGFBP2 normalisiert mit GAPDH unter den vier Kulturbedingungen an Tag 5.

Erläuterung: Es konnten keine Unterschiede zwischen den vier Kulturbedingungen gezeigt werden.

3.4.2 Apolipoprotein D (ApoD)

Die Expression von ApoD konnte bei den Vorhautfibroblasten aller 11 Probanden unter allen vier Kulturbedingungen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 8).

Ein signifikanter Unterschied in der ApoD-Expression bei den mit DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten sowohl in Flaschen-, als auch in Integra®-Matrix-Kulturen gegenüber den ohne DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten lag nicht vor (siehe Tabelle 9). Die Mediane zeigten jedoch eine vermehrte ApoD-Expression bei den mit DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten (siehe Tabelle 8). Zudem zeigte sich ein Unterschied in der Expression von ApoD beim Vergleich zwischen Flaschen- und Integra®-Matrix-Kulturen mit Zusatz von DHT (siehe Tabelle 9). Sie war bei den Integra®-Matrix-Kulturen vermehrt (siehe Tabelle 8).

Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass ApoD ein potenzielles Androgen-responsives Gen ist. Zwar konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den mit DHT- und ohne DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten gefunden werden. Betrachtet man jedoch die Mediane zeigt sich eine vermehrte ApoD-Expression bei den mit DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten sowohl aus Flaschen- als auch aus Integra®-Matrix-Kulturen. Zudem scheint auch das Wachstum in der dreidimensionalen Integra®-Matrix die ApoD-Expression zu steigern.

	Flasche - DHT	Flasche + DHT	Matrix - DHT	Matrix + DHT
Proband 1	0,06	0,95	0,78	3,9
Proband 2	0,4	1,72	0,72	8,33
Proband 3	0,53	7,16	2,76	8,76
Proband 4	0,87	4,32	0,77	16,99
Proband 5	0,22	7,71	0,51	18,98
Proband 6	0,21	1,74	0,11	9,81
Proband 7	0,52	3,29	2,35	25,86
Proband 8	0,07	0,33	0,59	1,44
Proband 9	0,06	1,74	0,22	5,8
Proband 10	2,69	1,85	8,71	4,79
Proband 11	1,65	11,2	2,23	36,52
Median	0,4	1,85	0,77	8,76
25 %-Quantil	0,07	1,72	0,51	4,79
75 %-Quantil	0,87	7,16	2,35	18,98
Minimum	0,06	0,33	0,11	1,44
Maximum	2,69	11,2	8,71	36,52

Tabelle 8: Normalisierte Ratio ApoD/GAPDH der vier unterschiedlichen Kulturbedingungen der Vorhautfibroblasten (Flaschenkultur ohne DHT-Zusatz, Flaschenkultur mit DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur ohne DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur mit DHT-Zusatz) der 11 Probanden an Tag 5

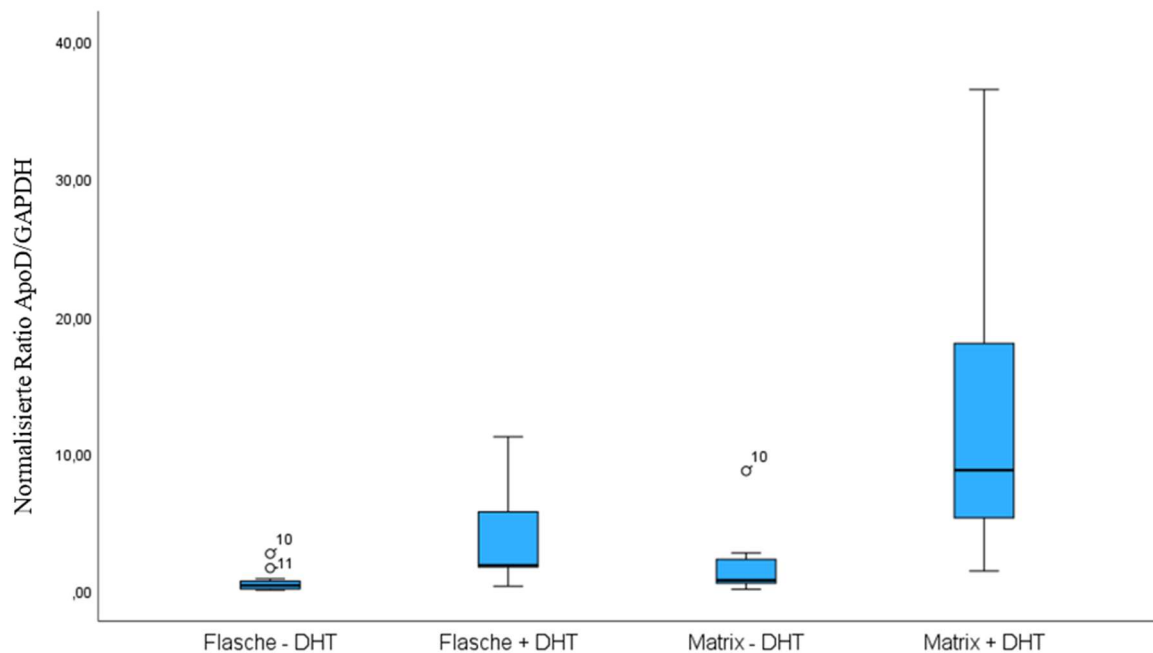


Abbildung 15: Grafische Darstellung der relativen Expressionsdaten der ApoD-RNA als normalisierte Ratio ApoD/GAPDH der vier unterschiedlichen Kulturbedingungen der Vorhautfibroblasten (Flaschenkultur ohne DHT-Zusatz, Flaschenkultur mit DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur ohne DHT-Zusatz, Integra®-Matrix-Kultur mit DHT-Zusatz) der 11 Probanden an Tag 5 als Boxplot

Erläuterung: Der Bereich, in dem sich 50% der erhobenen Werte befanden, war bei den ohne DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten der Flaschen- und Integra®-Matrix-Kulturen klein. Wohingegen dieser Bereich bei den mit DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten der Flaschen- und Integra®-Matrix-Kulturen groß war. Gleiches galt für die Spannweite zwischen dem Minimum und Maximum. Die mit Punkten markierten Werte der Probanden 10 und 11 waren Ausreißer.

	Mediandifferenz	Z-Wert	p-Wert
Flasche + DHT – Flasche - DHT	1,45	-2,756	0,006
Matrix + DHT – Matrix - DHT	7,99	-2,667	0,008
Matrix - DHT – Flasche - DHT	0,37	-2,669	0,008
Matrix + DHT – Flasche + DHT	6,91	-2,934	0,003

Tabelle 9: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur Analyse der Expression von ApoD als normalisierte Ratio mit GAPDH unter den vier Kulturbedingungen an Tag 5.

Erläuterung: Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von ApoD bei mit DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten gegenüber ohne DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten, weder bei Flaschen- noch bei Integra®-Matrix-Kulturen. Jedoch bestand ein Unterschied in der ApoD-Expression beim Vergleich zwischen den in Integra®-Matrix-Kulturen mit DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten gegenüber den in Flaschenkulturen mit DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten.

4 Diskussion

In unterschiedlichen Bereichen besteht ein Interesse an einer artifiziellen Genitalhaut. So könnte diese in der urogenitalen Chirurgie im Bereich der rekonstruktiven Chirurgie nach Verletzungen, aber auch bei urogenitalen Fehlbildungen und bei geschlechtsangleichenden Operationen als Hautersatz eingesetzt werden. In der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie werden zudem Hautmodelle für die Testung von Medikamenten und Kosmetika gesucht. Aber auch in der Grundlagenforschung besteht ein großes Interesse an experimentellen Systemen und Versuchseinheiten, die den In-vivo-Zustand möglichst genau imitieren. Hier erfolgen die meisten Untersuchungen bisher an sogenannten Monolayerkulturen, deren Ergebnisse durch den Mangel an Dreidimensionalität nur eingeschränkt auf den In-vivo-Zustand übertragbar sind. Von einem dreidimensionalen Modell wird angenommen, dass es komplexe Aspekte besser in vitro modellieren kann.

Daher war das erste Ziel dieser Arbeit ein dreidimensionales genitales Dermismodell unter der Verwendung einer mit Vorhautfibroblasten besiedelten Matrix zu entwickeln. Dieses Ziel konnte erreicht werden. Die Vorhautfibroblasten besiedelten nicht nur die Integra®-Matrix, sondern vermehrten sich auch in ihr. Der Einfluss der dreidimensionalen Anordnung der Zellen auf die Expression des Androgenrezeptors und möglicher Androgen-responsiver Gene wurde daraufhin durch den Vergleich mit Monolayerkulturen untersucht. Die Hypothese war, dass zwischen den beiden Kulturbedingungen ein Unterschied in Bezug auf die Menge des durch die Vorhautfibroblasten exprimierten Androgenrezeptors, die Expression der Androgenrezeptor-RNA sowie die Expression möglicher Androgen-responsiver Gene besteht. Die Untersuchungen zeigten jedoch keinen Unterschied in Bezug auf die Androgenrezeptorproteinmenge und die Androgenrezeptor-RNA-Expression bei dem Vergleich von Integra®-Matrix-Kulturen und Monolayerkulturen. Es ließ sich aber eine Steigerung der ApoD-Expression bei den Integra®-Matrix-Kulturen mit Zusatz von 10 nM DHT gegenüber den Monolayerkulturen mit Zusatz von 10 nM DHT nachweisen. Die Expressionsdaten von IGFBP2 hingegen ergaben keinen Unterschied bei dem Vergleich von Integra®-Matrix- und Monolayerkulturen.

Des Weiteren erfolgte die erste Anwendung der Integra®-Matrix-Kultur als Versuchseinheit zum Nachweis Androgen-responsiver Gene. Deren Kenntnis würde zu einem besseren

Verständnis der Androgen-abhängigen Vorgänge bei 46, XY-Karyotyp beitragen und könnte neue Diagnostikmöglichkeiten bei Androgenresistenz-Patienten ohne Nachweis einer Androgenrezeptorgenmutation eröffnen. Eine Androgenresistenz (AIS) liegt vor, wenn bei einem 46, XY-Karyotyp die Ansprache der Zielzellen auf Androgene bei bestehenden Hoden und altersentsprechenden Androgenkonzentrationen im Körper komplett oder auch nur in Teilen fehlt (Quigley et al., 1995). Klinisch wird zwischen drei Formen unterschieden: der kompletten Androgenresistenz (CAIS), der partiellen Androgenresistenz (PAIS) und der milden Androgenresistenz (MAIS). Durch DNA-Sequenzierung kann bei mehr als 95 % der CAIS-Patienten die ursächliche Mutation des Androgenrezeptorgens identifiziert werden (Hughes et al., 2012, Gulia et al., 2018). Allerdings findet sich nur bei weniger als 40 % der PAIS-Patienten eine verantwortliche Mutation (Lucas-Herald et al., 2016). Somit basiert die Diagnose einer partiellen Androgenresistenz auch heute noch häufig ausschließlich auf klinischen Aspekten ohne Nachweis der genauen Ursache. Hier werden noch nicht identifizierte Funktionsstörungen des Androgenrezeptors oder Störungen der Androgen-vermittelten Signalwege, die nicht auf eine Androgenrezeptorgenmutation zurückzuführen sind, vermutet. Die Hypothese dieser Arbeit war, dass es durch Zusatz von DHT zum Kulturmedium der Vorhautfibroblasten zu einer Steigerung der Genexpression potenzieller Androgen-responsiver Gene kommt, die sich so nachweisen lassen. Daher erfolgten vergleichende Untersuchungen der Genexpression von Vorhautfibroblasten, die mit und ohne Zusatz von 10 nM DHT kultiviert wurden. Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe ergaben zwei potenzielle Androgen-responsive Gene, Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) und Apolipoprotein D (ApoD), deren Expression in den Zellkulturen dieser Arbeit mittels RT-PCR vergleichend untersucht wurden. Hier konnte kein signifikanter Unterschied in der Apolipoprotein D-Expression gezeigt werden. Es bestanden jedoch Hinweise, dass es sich trotzdem um ein potenzielles Androgen-responsives Gen handeln könnte, da die Mediane der normalisierten Ratio ApoD/GAPDH bei den Vorhautfibroblasten mit DHT-Zusatz aus Flaschen- und Integra®-Matrix-Kulturen höher ausfielen als die der Vorhautfibroblasten ohne DHT-Zusatz aus Flaschen- und Integra®-Matrix-Kulturen. Ein signifikanter Unterschied in der Genexpression von Insulin-like growth factor binding protein 2 bestand nicht und auch die Mediane zeigten keine wesentlichen Unterschiede.

4.1 Erstellung des genitalen Dermismodells

Für das genitale Dermismodell ebenso wie für die vergleichenden Monolayerkulturen wurden Vorhautfibroblasten gesunder Probanden als Versuchszellen verwendet. Zum einen sind Vorhautfibroblasten ein typischer Bestandteil der männlichen Genitalhaut, zum anderen sind sie für Studien, die die Struktur, Funktion und Aktivität des Androgenrezeptors untersuchen, häufig genutzte Versuchszellen (Palma et al., 2002). Sie eignen sich besonders gut, da es sich um menschliche Zellen handelt, die eine hohe Androgenrezeptorexpression aufweisen und unter kontrollierten Bedingungen angezchtet werden können (Brown und Migeon, 1981). Vorteilhaft ist zudem die gute Verfügbarkeit, da sie im Rahmen von Zirkumzisionsoperationen einfach zu gewinnen sind.

Integra® ist eine aus vernetztem Rindersehnenkollagen und Haifischknorpel-Glykosaminoglykanen (Chondroitin-6-Sulfat) bestehende poröse Matrix, die in der Verbrennungsmedizin zur Wundversorgung von in die tieferen Hautschichten reichenden Verbrennungen genutzt wird. Hier wird sie als Dermisersatz verwendet, verbessert die Besiedlung der Wundfläche mit Fibroblasten, Makrophagen und Kapillaren aus dem Wundbett und führt zu einem besseren Heilungsergebnis (Stern et al., 1990, Machens et al., 2000). Seit 2016 besteht zudem die FDA-Zulassung zur Therapie von Ulzera bei diabetischem Fussyndrom (Chang et al., 2019). Aber auch in anderen Bereichen der rekonstruktiven Chirurgie z. B. nach Entfernung großer kongenitaler melanozytärer Naevi wird Integra® erfolgreich eingesetzt (Chang et al., 2019).

Ähnliche Hautmodelle bestehend aus einem dreidimensionalen Gerüst besiedelt mit menschlichen Zellen wurden bereits erfolgreich von anderen Arbeitsgruppen und Firmen wie der Firma Advanced Tissue Science hergestellt (Rheins et al., 1994, Purdue, 1997, Atala et al., 2015). Integra® selbst wurde bisher nicht zur Herstellung von experimentellen Genitalhautmodellen genutzt, erscheint aber aufgrund des erfolgreichen klinischen Einsatzes als geeignet. Um festzustellen, ob die Besiedlung der Integra®-Matrix mit den Vorhautfibroblasten erfolgreich war, erfolgten die initialen Wachstumsversuche. Hier konnte durch den Nachweis steigender Protein- und RNA-Mengen sowie mittels eines MTT-Reduktions-Assays die Zunahme der Menge an vitalen Vorhautfibroblasten in der Integra®-Matrix und damit die erfolgreiche Besiedlung und Vermehrung gezeigt werden. Auch immunhistologisch wiesen wir die Vorhautfibroblasten im Kollagengerüst nach.

Zu bedenken ist aber, dass es sich auch bei dieser Zellkultur um ein sehr artifizielles System handelt. Interaktionen unterschiedlicher Zelltypen sowie neuronale und endokrine Einflüsse fehlen, was die Übertragbarkeit auf die in vivo ablaufenden Prozesse einschränken kann. Studien haben aber gezeigt, dass die Kultur in einer dreidimensionalen Matrix durch Steigerung der Dimensionalität der Extrazellulärmatrix die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung, die Reaktion auf mechanische Einwirkungen und das Überleben der Zellen erheblich beeinflussen kann und somit in dieser Hinsicht eine Verbesserung darstellt (Duval et al., 2017).

4.2 Klinische Anwendbarkeit

Der im Bereich der rekonstruktiven Chirurgie bestehende Bedarf an einem Genitalhautersatz beruht auf einem häufig bestehenden Mangel an nativer Genitalhaut. So treten beispielsweise bei Patienten mit schweren Formen der Hypospadie bei korrigierenden Operationen auch aufgrund von unzureichendem Material für die Rekonstruktionen komplizierte Verläufe mit unbefriedigendem Ergebnis für die Patienten auf (Sircili et al., 2010). Ein artifizierender Genitalhautersatz muss aber vielen Ansprüchen genügen. Er soll der echten Genitalhaut möglichst ähnlich sein, eine ausreichende Stabilität besitzen und die Barrierefunktion des natürlichen Gewebes imitieren. Auch das Potential mitzuwachsen ist wichtig. Die Matrix sollte durch den Körper abgebaut werden können ohne toxische Abbauprodukte zu bilden und durch die körpereigene Extrazellulärmatrix ergänzt werden (Atala et al., 2015). Aktuell gibt es in Deutschland kein Produkt, das diesen Ansprüchen vollständig entspricht. Entscheidend für den Erfolg eines Genitalhautersatzes ist die Affinität der Zellen zu der Extrazellulärmatrix, die Dichte der Zellbindungsstellen, das Vorhandensein von Signalstoffen, die Verfügbarkeit von Nährstoffen und die Entfernung von Abbauprodukten (Park et al., 2000).

Der Einsatz von Integra® als Dermisersatz ist für andere Körperregionen bereits etabliert. Sie dient dort als Leitstruktur für einsprossende Zellen wie beispielsweise Fibroblasten (Stern et al., 1990, Machens et al., 2000, Chang et al., 2019).

Das hier entwickelte Modell zeigt neben der Nutzung als experimentelles System auch Potential für eine therapeutische Anwendung, da Integra® viele der geforderten Ansprüche erfüllt. Die Integra®-Matrix ist stabil, kann durch den Körper abgebaut werden und die

Vorhautfibroblasten lassen sich gut ansiedeln (Kremer und Berger, 2000). Aktuell ist aber die Zelldichte in der Integra®-Matrix-Kultur durch einige limitierende Faktoren noch zu gering. So ist das Wachstum ab Tag 5 eingeschränkt, was vermutlich auf die mangelnde Nährstoffversorgung und die Zunahme der Abbauprodukte zurückzuführen ist. Eine Verbesserung der Nährstoffversorgung und Entfernung von Abbauprodukten könnte z.B. durch ein durchfließendes Medium gewährleistet werden. Zudem handelt es sich aktuell um ein reines Dermismodell. Eine Weiterentwicklung mit Integration einer deckenden Keratinozyten- oder Urothelschicht wäre wünschenswert.

4.3 Einfluss der Dreidimensionalität auf die Vorhautfibroblasten

In vivo befinden sich Zellen in einem dreidimensionalen Gewebsverbund. Das hier entwickelte genitale Dermismodell sollte eine Annäherung an diesen In-vivo-Zustand darstellen. Durch die dreidimensionale Anordnung der Vorhautfibroblasten können diese Zell-zu-Zell-Interaktionen sowie Interaktion mit der Extrazellulärmatrix eingehen, die in Monolayerkulturen nicht möglich wären. Beim Vergleich der beiden Kulturbedingungen, Integra®-Matrix- und Monolayerkultur, sollte nun untersucht werden, ob dieser Unterschied Auswirkungen auf die Gen- und Proteinexpression der Vorhautfibroblasten hat.

In beiden Kulturen ließen sich die Vorhautfibroblasten gut kultivieren. Verglichen wurden die Androgenrezeptorexpression auf Protein- und RNA-Ebene sowie die Expression der potenziell Androgen-responsiven Gene IGFBP2 und ApoD in den Integra®-Matrix-Kulturen und den Monolayerkulturen. Es lag kein Unterschied bei der Expression des Androgenrezeptors auf Protein- und RNA-Ebene vor. Auch die Expression von IGFBP2 war ohne Unterschied zwischen den Kulturbedingungen. Die ApoD-Expression hingegen war bei den Integra®-Matrix-Kulturen mit DHT-Zusatz gegenüber den Monolayerkulturen mit DHT-Zusatz erhöht. Dies könnte darin begründet sein, dass es zu einer dem In-vivo-Zustand ähnlicheren Zell-zu-Zell-Interaktion und auch zu einer dem In-vivo-Zustand ähnlicheren Interaktion mit der Extrazellulärmatrix kommt. Durch die Zell-zu-Zell-Interaktion und die Interaktion mit der Extrazellulärmatrix im dreidimensionalen Verbund könnte die Regulation bestimmter Gene verändert werden und so den in vivo ablaufenden Prozessen eher entsprechen. In der Literatur finden sich dreidimensionale Zellkulturen vor allem bei

Untersuchungen, die den Einfluss der Mikroumgebung auf Tumorzellen und deren Eigenschaften analysieren (Sieh et al., 2012, Taubenberger et al., 2016). Hier zeigt sich zunehmend, dass sich in dreidimensionalen Zellkulturen gewachsene Zellen deutlich in ihren Eigenschaften von denen in zweidimensionalen Flaschenkulturen gewachsenen Zellen unterscheiden (Griffith und Swartz, 2006, Bott et al., 2010). Durch die weitere Dimension bestehen andere räumliche Verteilungen der Zellbindungsstellen und physikalische Grenzen, die Einfluss auf die Zellkontraktion, die Signalwege vom Äußeren der Zelle in ihr Inneres und auf die Zellmigration nehmen (Griffith und Swartz, 2006). In der Studie von Sieh et al. (2012) wurden die Wachstumseigenschaften ebenso wie die Genexpression von LNCaP-Zellen einer Monolayerkultur mit der einer dreidimensionalen Hydrogelkultur mit und ohne Inkubation mit R1881, einem künstlichen Androgen, verglichen. In der Hydrogelkultur zeigten sich im Gegensatz zur Monolayerkultur tumorähnliche Morphologien wie zentrale hypoxische und apoptotische Bereiche. Nach Hinzufügen von R1881 für 48 h wurde die Menge des Androgenrezeptors und die Expression Androgen-responsiver Gene untersucht. Hier zeigte sich, dass der nukleäre Androgenrezeptor in den LNCaP-Zellen der Hydrogelkultur vermindert gegenüber dem der Monolayerkultur war, wohingegen die Expression Androgen-responsiver Gene gleich war. Eine vermehrte Expression Androgen-responsiver Gene zeigte sich hingegen im Vergleich zwischen der Hydrogelkultur und der Monolayerkultur ohne Inkubation mit R1881. Zudem waren für die Cholesterol- und Steroidbiosynthese verantwortliche Gene vermehrt exprimiert. Es wurde vermutet, dass die Grundexpression Androgen-responsiver Gene aufgrund zunehmender Zell-zu-Zell-Interaktion und Zelldichte gesteigert ist. Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass Integrine und Hypoxie die Sensitivität des Androgenrezeptors gegenüber Androgenen steigern (Park et al., 2006, Zhang et al., 2007). Im Gegensatz hierzu war in der aktuellen Arbeit die Expression des potenziell Androgen-responsiven Gens ApoD in den Integra®-Matrix-Kulturen mit DHT-Zusatz gegenüber den Monolayerkulturen erhöht, nicht aber ohne DHT-Zusatz. Dies ist möglicherweise auch durch eine vermehrte Grundexpression der Androgen-responsiven Gene aufgrund zunehmender Zell-zu-Zell-Interaktion und Zelldichte, die durch DHT-Zusatz weiter gesteigert wurde, zu erklären. Unterschiede in der Androgenrezeptormenge konnten nicht gezeigt werden. Dies ist möglicherweise auf die unterschiedlichen Versuchszellen zurückzuführen, da LNCaP-Zellen im Vergleich zu den Vorhautfibroblasten mehr Androgenrezeptoren exprimieren und somit

feinere Unterschiede deutlicher hervortreten. Ein Unterschied zwischen der IGFBP2-Expression von Integra®-Matrix-Kultur und Monolayerkultur war, nachdem es als Androgenresponsives Gen nicht bestätigt werden konnte, nicht zu erwarten.

4.4 Nutzung als Versuchseinheit in der DSD-Forschung

Nach erfolgreicher Besiedlung der Integra®-Matrix erfolgte die erste Anwendung der Integra®-Matrix-Kultur als Versuchseinheit zum Nachweis potenzieller Androgenresponsiver Gene. Hier stellte sich zunächst die Frage, welche Voraussetzungen für diese Untersuchungen erfüllt sein müssen.

Da nur ein funktionsfähiger Androgenrezeptor seine Aufgabe als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor erfüllen und die Genexpression der Zelle beeinflussen kann, wiesen wir ihn mittels Immunhistologie, Westernblot und RT-PCR optisch, auf Protein- und RNA-Ebene bei den Vorhautfibroblasten aller Probanden nach. Hierdurch wurde allerdings nur seine Existenz nachgewiesen, nicht aber seine Funktionsfähigkeit. Aufgrund des phänotypischen Bildes der Probanden gingen wir aber von einer normalen Funktion aus. Durch die Immunhistologie konnte aufgrund von technischen Einschränkungen wie unterschiedliche Intensitäten der Hintergrundfärbung und der geringen Anfärbbarkeit der Vorhautfibroblasten selbst nur ein erster Eindruck zur Lokalisation des Androgenrezeptors und zur Ausprägung der Androgenrezeptorexpression erlangt werden. Hier zeigten sich Hinweise auf eine vermehrte Expression des Androgenrezeptors bei den Vorhautfibroblasten, die mit DHT-Zusatz angezüchtet wurden. Dies konnte auf Proteinebene mittels Westernblot bestätigt werden. Zurückzuführen ist das auf die stabilisierende Funktion des DHT auf die vorliegenden Androgenrezeptoren (Gad et al., 1988, Furutani et al., 2002, Chaturvedi und Dehm, 2019). Auf RNA-Ebene konnte hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Kulturbedingungen festgestellt werden. Auch dies passt zu vorhergehenden Ergebnissen, bei denen ebenfalls kein signifikanter Einfluss von Androgenen auf die Expression der Androgenrezeptor-RNA nachgewiesen wurde (Choudhry et al., 1993).

4.5 Nachweis Androgen-responsiver Gene

c-DNA-Microarray-Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe hatten bereits zwei potenzielle Androgen-responsive Gene identifiziert. Hierbei handelte es sich zum einen um Insulin-like growth factor binding protein 2 und zum anderen um Apolipoprotein D, deren Expression bei Anzucht mit DHT-Zusatz im Kulturmedium im Vergleich zur Anzucht ohne DHT-Zusatz erhöht war. Da die Voruntersuchungen aber nur an einer sehr kleinen Probandengruppe durchgeführt wurden, sollten deren Ergebnisse am Probandenkollektiv dieser Arbeit überprüft werden.

Die Untersuchungen zum Nachweis der potenziellen Androgen-responsiven Gene erfolgten mittels Real-Time-PCR. Hierbei handelt es sich um ein etabliertes Verfahren mit einer hohen Sensitivität und Reproduktionsfähigkeit (Heid et al., 1996). Vorteilhaft ist zudem, dass geringere Mengen mRNA benötigt werden.

In der Literatur finden sich cDNA-Microarray-Studien, die ebenfalls die Genexpression in Vorhautfibroblasten nach Zusatz von 100 nM DHT untersuchten. In diesen Studien konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Vorhautfibroblasten mit DHT-Zusatz und ohne DHT-Zusatz festgestellt werden (Holterhus et al., 2003, Bebermeier et al., 2006). Auch in der aktuellen Arbeit konnte bei den zwei untersuchten Genen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Hinweise, dass es sich bei ApoD um ein potenzielles Androgen-responsives Gen handelt, fanden sich aber bei Betrachtung der Mediane der normalisierten Ratio ApoD/GAPDH, die bei den mit DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten im Vergleich zu den ohne DHT-Zusatz Angezüchteten höher ausfielen. Vergleicht man nun das Studiendesign mit dem Aktuellen, so zeigt sich, dass die Vorhautfibroblasten in den vorangegangenen Studien nicht von Beginn an mit DHT angezüchtet wurden bzw. zusätzlich im Laufe der Zellkultur eine 24-stündige DHT-Pause mit nachfolgendem erneutem DHT-Zusatz bis zu einer Konzentration von 1000 nM DHT für 24 Stunden erfolgte. Wohingegen in der aktuellen Arbeit bereits bei Initiierung der Zellkultur DHT dem Zellkulturmedium hinzugefügt wurde. Somit könnten die Ergebnisse der vorangegangenen Studien darin begründet sein, dass ohne dauerhaften ununterbrochenen DHT-Zusatz die Vorhautfibroblasten im Laufe der Kulturzeit ihre Ansprechbarkeit auf Androgene verlieren. Da die aktuelle Arbeit aber auch kein signifikantes Ergebnis, sondern lediglich einen Hinweis auf ApoD als Androgen-responsives Gen lieferte, ist eine Wiederholung der

Untersuchungen an einem deutlich größeren Probandenkollektiv sinnvoll und könnte möglicherweise ApoD als Androgen-responsives Gen bestätigen.

4.5.1 Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)

Die Voruntersuchungen hatten ergeben, dass unter Zusatz von 10 nM DHT in das Kulturmedium die Insulin-like growth factor binding protein 2-Expression in den Vorhautfibroblasten gesteigert wurde. Dieses konnte durch die Real-Time-PCR-Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden.

Es scheint dennoch ein Zusammenhang zwischen Androgenen, dem Androgenrezeptor und den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF) sowie deren Bindungsproteinen zu bestehen. Gemeinsam scheinen sie Einfluss auf die Bildung des äußeren männlichen Genitals und der sekundären Geschlechtsmerkmale während der Pubertät zu haben. Bei dem Vergleich von Vorhautfibroblasten gesunder Probanden mit Labienfibroblasten von 46, XY CAIS-Patienten nach Testosteronzusatz wurde eine deutliche Abnahme der IGF-2- und IGFBP2-Sekretion in den Labienfibroblasten gemessen (Elmlinger et al., 2001). Da es sich bei IGF-2 um einen wichtigen Regulator fetalen Wachstums handelt, ist dies möglicherweise ein Grund für die ausbleibende Entwicklung männlicher Geschlechtsmerkmale bei CAIS-Patienten. Es besteht die Vermutung, dass IGF-2 und IGFBP2 als Vermittler der Androgenwirkung auf die Entwicklung der männlichen Geschlechtsmerkmale während des fetalen Wachstums fungieren. In einer anschließenden Studie, bei der erneut die Expression von IGF-2 und IGFBP2 in Genitalhautfibroblasten gesunder Probanden mit denen von CAIS-Patienten nach Zusatz von Testosteron und DHT untersucht wurde, konnten diese Ergebnisse nur teilweise reproduziert werden. Es zeigte sich erneut eine verminderte Sekretion von IGF-2 in den Genitalhautfibroblasten der CAIS-Patienten, aber im Gegensatz zu der vorangegangenen Arbeit schien IGFBP2 in den Genitalhautfibroblasten der CAIS-Patienten unabhängig von der Androgenzufuhr hochreguliert. Die Autoren vermuteten, dass diese widersprüchlichen Ergebnisse auf den Gebrauch älterer Fibroblasten und auf unterschiedliche Zellkulturbedingungen, die zu einer höheren Zelldichte führten, was wiederum die IGFBP2-Expression steigert, zurückzuführen waren. Insgesamt konnte die Studie aber keinen oder nur einen schwachen Einfluss von Androgenen auf die IGFBP2-Expression in Genitalhautfibroblasten zeigen (Diesing et al., 2003).

In Prostatakarzinomzellen scheint die IGFBP2-Expression durch Androgene auf unterschiedlichen Ebenen beeinflusst zu werden, was zu einer widersprüchlichen Studienlage führt. So zeigen einige Studien, dass die IGFBP2-Expression in LnCaP-Zellen durch Androgene gesteigert wird. Andere Studien kommen hingegen zu dem gegenteiligen Ergebnis, nämlich einer Abnahme der IGFBP2-Expression unter Androgenzufuhr (Degraff et al., 2010).

Das Insulin-like growth factor binding protein 2 gehört zu der Familie der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktorenbindungsproteinen bestehend aus insgesamt 6 Mitgliedern (IGFBP 1 - 6), die in verschiedenen Geweben sezerniert werden und mit einer hohen Affinität an Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF-1, IGF-2), aber nur mit geringer Affinität an Insulin binden (Yu und Rohan, 2000). IGFBP2 hat hierbei eine höhere Affinität zu IGF-2 (Hoeflich und Russo, 2015). Diese löslichen Trägerproteine transportieren nicht nur IGF im Kreislauf, sondern auch aus dem Gefäßsystem ins Gewebe und modulieren zudem deren Rezeptorinteraktionen sowie ihre wachstumsfördernden Aktivitäten (Clemmons, 1993). Des Weiteren konnten aber auch IGF-unabhängige Funktionen nachgewiesen werden (Baxter, 2014).

Alle IGFBP werden von stark konservierten Genen kodiert, wobei die am meisten konservierten Regionen den Bereich der N-terminalen Ligandenbindungsdomäne und der für die Protein-Protein bzw. Protein-Extrazellulärmatrix-Interaktion wichtigen C-terminalen Region kodieren (Kelley et al., 1996). Ihre Synthese wird durch Gen-regulierende Elemente, aber auch durch andere Faktoren bestimmt. Im Anschluss an ihre Synthese durchlaufen die IGFBP häufig weitere posttranslationale Modifizierungen, die sich auf ihre Funktion auswirken können (Clemmons, 1993, Hoeflich und Russo, 2015).

Insbesondere die Amino- und Karboxylenden aller IGFBPs sind stark konserviert und enthalten mindestens 14 Cysteine. Im gering konservierten zentralen Bereich hingegen befindet sich eine cysteinfreie Region (Clemmons, 1993).

Das IGFBP2-Gen befindet sich in der Region q33-q34 auf Chromosom 2 (Lamson et al., 1991, Shimasaki und Ling, 1991, Hoeflich und Russo, 2015), hat eine Länge von 32 kb und setzt sich aus 4 Exons und 3 Introns zusammen. Es kodiert ein aus 289 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer Masse von 36 kDa. Es kann in 3 Bereiche aufgeteilt werden, die N-terminale Cystein-reiche Region und die C-terminale Cystein-reiche Region, die beide an

der IGF-Bindung beteiligt und durch eine Link Region verbunden sind (Hoeflich und Russo, 2015, Li et al., 2020). Glykolisierte Formen sind nicht bekannt (Shimasaki und Ling, 1991). Es enthält eine RGD-Sequenz (Arginin, Glycin, Asparaginsäure) an Position 265-267 mit der es an Integrine, unter anderem $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha V\beta 3$, binden kann (Hynes, 1987, Pereira et al., 2004). Des Weiteren liegt in der Link Region eine Heparin-Bindungs-Domäne vor, mit der IGFBP2 an Komponenten der Extrazellulärmatrix bindet. Zudem ist sie notwendig für IGFBP2-vermittelte Zellproliferation und -migration (Li et al., 2020). Des Weiteren enthält es ein Kernlokalisierungssignal (NLS), das für Interaktionen mit Importin- α notwendig ist (Azar et al., 2014). IGFBP2 wird in einer Reihe verschiedener Gewebe exprimiert, insbesondere im ZNS, im Liquor und in Reproduktionsgeweben (Wood et al., 1990, Kelley et al., 1996). Beeinflusst wird seine Expression unter anderem durch hormonelle Faktoren, die abhängig vom Gewebe zu einer vermehrten oder verminderten Expression führen (Hoeflich et al., 2014). Nach Translation des reifen IGFBP2-Peptids kann dieses durch verschiedene Proteasen gespalten werden, was die Affinität von IGFBP2 zu IGF reduzieren und somit deren Wirkungen auf die Gewebe beeinflussen kann (Mark et al., 2005).

4.5.2 Apolipoprotein D (ApoD)

In den Voruntersuchungen war Apolipoprotein D als potenzielles Androgen-responsives Gen identifiziert worden. In den Real-Time-PCR-Untersuchungen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Apolipoprotein D-Expression bei Zusatz von 10 nM DHT zum Kulturmedium gezeigt werden. Allerdings ergaben sich beim Vergleich der Mediane der normalisierten Ratio von ApoD/GAPDH der mit DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten und der ohne DHT-Zusatz angezüchteten Vorhautfibroblasten Hinweise auf eine gesteigerte ApoD-Expression durch den Zusatz von 10 nM DHT zum Kulturmedium. Somit besteht weiterhin die Vermutung, dass ApoD ein potenzielles Androgen-responsives Gen ist.

Bereits 2009 benannte Appari et al. ApoD als Androgen-responsives Gen. Damals wurde die Genexpression nach Zusatz von 10 nM DHT in Skrotalhautfibroblasten gesunder 46, XY Probanden mit der von Labia majora-Fibroblasten von 46, XY CAIS-Patienten verglichen. Hier zeigte sich eine Hochregulierung von ApoD in den Skrotalhautfibroblasten, nicht aber in den Labia majora-Fibroblasten, was mit der fehlenden Funktionsfähigkeit des

Androgenrezeptors und damit der fehlenden Androgenwirkung im Falle der CAIS-Patienten erklärt wurde. Appari et al. betrachtete ApoD daher als potenziellen Biomarker der Androgenrezeptorfunktion. Die aktuelle Arbeit lässt dies ebenfalls vermuten. Ammerpohl et al. untersuchte 2013 die DNA-Methylierung in Genitalhautfibroblasten von 46, XY AIS-Patienten im Vergleich zu 46, XY Probanden mit regelrechter Androgenrezeptorfunktion. Hier zeigte sich eine signifikant höhere ApoD-Promoter-Methylierung bei den AIS-Patienten. Unter der Annahme, dass eine verminderte Genaktivierung aufgrund des Rezeptordefekts in einer gesteigerten DNA-Methylierung dieser Gene mündet, könnte dies ein weiterer Hinweis auf ApoD als Androgen-responsives Gen sein. Diese Entdeckung stellt somit eine mögliche Diagnostikmöglichkeit für Patienten mit dem Verdacht auf eine Androgenresistenz ohne Nachweis einer Androgenrezeptorgenmutation dar und könnte zu einer auf funktionellen Aspekten basierenden Einordnung der unterschiedlichen AIS-Patienten führen. Unter dieser Annahme führten Hornig et al. 2016 einen ApoD-Assay durch, bei dem die DHT-induzierte ApoD-Expression in Genitalhautfibroblasten gemessen und gleichzeitig nach Androgenrezeptorgenmutationen gesucht wurde. Hierbei ließen sich die genetisch gesicherten AIS-Patienten durch den ApoD-Assay eindeutig von den Kontroll-Probanden abgrenzen. Aber auch eine Gruppe von DSD-Patienten ohne Nachweis einer Androgenrezeptorgenmutation mit dem klinischen Bild einer Androgenresistenz konnte mittels des Assays identifiziert werden. Somit bestätigte diese Studie ApoD als Androgen-responsives Gen und zeigte, dass es als diagnostischer Marker genutzt werden kann. Hornig et al. bezeichneten diese mittels ApoD-Assay nachgewiesene Form der Androgenresistenz ohne Nachweis einer Androgenrezeptorgenmutation als Androgenresistenz Typ II (AIS Typ II). Eine Korrelation von ApoD-Assay und Schweregrad des AIS konnte in dieser Studie aber nicht gezeigt werden. Hierfür sind weitere Studien notwendig. In einer dieser Arbeit ähnlichen Studie von Tanase-Nakao et al. wurde 2019 die DHT-induzierte Transkriptionsrate von Genitalhautfibroblasten von vier Jungen ohne AR-Veränderungen und eines PAIS-Patienten mittels Microarray-Analyse untersucht. Hierbei wurden 24 Transkripte gefunden, die durch DHT hoch- oder runterreguliert waren, allerdings ohne, dass eine signifikante Änderung der Genexpression gezeigt werden konnte. Unter den hochregulierten Genen war auch ApoD, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt.

Weitere Untersuchungen zur genauen Rolle des ApoDs in der Geschlechtsentwicklung bei 46, XY-Karyotyp müssen aber noch erfolgen. Eine Theorie ist, dass es seinen Einfluss durch Regulierung der Angiogenese ausübt. Aber auch eine Rolle im Rahmen der Zell-zu-Zell-Interaktion wird vermutet (Rassart et al., 2020). Bekannt ist bereits, dass ApoD ebenfalls in Tumorzellen wie den ZR-75-1 epithelialen Brustkrebszellen und den LNCaP-Prostatakarzinomzellen gebildet wird (Simard et al., 1990, Simard et al., 1991). Studien an diesen Zellen zeigten, dass die ApoD-Expression durch Östrogene unterdrückt (Simard et al., 1990), durch Androgene und Dexamethason aber stimuliert wird (Simard et al., 1992). Auch dies lässt sich gut mit den Ergebnissen der aktuellen Arbeit in Einklang bringen. Des Weiteren steigert Interleukin-1 α sowie Retinolsäure in Brustkrebszellen die ApoD-Expression (Blais et al., 1994, Lopez-Boado et al., 1994). Wohingegen Interleukin-6 die ApoD-Sekretion und deren Stimulierung durch Androgene, Interleukin-1 α und Dexamethason vermindert (Blais et al., 1995).

ApoD ist ein 29-kDa-Glykoprotein, das der Familie der Lipocaline zugeordnet wird. McConathy und Alaupovic isolierten es 1973 aus Plasma High Density Lipoproteinen (HDL) (McConathy und Alaupovic, 1973). Zuvor wurde es auch aus Very High Density Lipoproteinen und in einer kleineren Menge aus Very Low Density Lipoproteinen (VLDL) isoliert (Ayrault Jarrier et al., 1963).

Das humane ApoD-Gen befindet sich in der p14.2 Region auf Chromosom 3 (Drayna et al., 1987). Es verteilt sich über mehr als 12.000 bp des humanen Genoms, wobei die mRNA-codierende Sequenz 815 bp ausmacht, da 5 Exons vorliegen (Drayna et al., 1987). Im Promotorbereich finden sich unter anderem Östrogen-, Progesteron-, Glukokortikoid- und Schilddrüsenhormon-responsive Elemente. Des Weiteren sind Akute Phase responsive Elemente, ebenso wie fettspezifische Elemente und ein Sterol-abhängiger Repressor anzutreffen (Lambert et al., 1993, Rassart et al., 2000). In Zellen, die einer Inflammation oder metabolischem Stress ausgesetzt werden, kann ein regulatorischer Einfluss von SRE1, AP-1, APR-3, NF κ B, PARP1, HnRNP-U, and APEX-1 auf die ApoD-Expression nachgewiesen werden (Sanchez und Ganfornina, 2021). Des Weiteren ist seine Expression vom Methylierungsgrad der DNA abhängig, wobei ein hoher Methylierungsgrad mit einer geringen ApoD-Transkription einhergeht. Zudem haben die stromaufwärts und -abwärts

gelegenen untranslatierten Regionen (UTR) Einfluss auf die ApoD-Expression (Sanchez und Ganfornina, 2021).

Die Primärstruktur des Proteins ist ein einzelner aus 189 Aminosäuren bestehender Polypeptidstrang, dessen Glykosylierung 18 % der Proteinmasse ausmacht. Er beinhaltet fünf Cysteine und ein Signalpeptid aus 20 hydrophoben Aminosäuren. Nach weiterer Verarbeitung bleibt ein aus 169 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem N-terminalen Glutamin zurück, dessen Molekulargewicht abhängig von der Glykosylierung zwischen 19 und 32 kDa variiert (McConathy und Alaupovic, 1976, Balbin et al., 1990). Der Glykosylierungsgrad ist hierbei gewebeabhängig, so hat zerebrales ApoD ein niedrigeres Molekulargewicht im Vergleich zu peripherem ApoD (Li et al., 2016). Zwischen Cystein 41 und 65 sowie zwischen Cystein 8 und 114 bestehen intramolekulare Disulfidbindungen. Cystein 116 ist zudem in der Lage mit anderen Makromolekülen Disulfidbindungen einzugehen (Yang et al., 1994, Rassart et al., 2000). Als Sekundärstruktur wird eine Anordnung von β -Platten und einer α -Helix postuliert. Die Tertiärstruktur entspricht dem für Lipocaline typischen achtsträngigen antiparallelen β -Fass, das einen Kelch mit einer zentral gelegenen Liganden-Bindungstasche bildet (Eichinger et al., 2007). Da seine Aminosäuresequenz keinerlei Ähnlichkeit mit der anderer Lipoproteine, sondern die höchste Übereinstimmungsrate mit dem Retinolbindungsprotein (RBP4) hat, wird ApoD als atypisches Lipoprotein bezeichnet (Dassati et al., 2014).

Als ApoD-Rezeptor wurde bisher das transmembrane Glykoprotein Basigin (BSG, CD 147), ein Mitglied der Immunglobulinfamilie, identifiziert. Es hat insbesondere Einfluss auf die Internalisierung von ApoD (Najyb et al., 2015). Des Weiteren wird das Membranprotein Scavenger receptor class B type 1 (SRB1) als ApoD-Rezeptor vermutet (Sanchez und Ganfornina, 2021).

ApoD wird in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert, im Gegensatz zu den anderen Lipoproteinen allerdings nur in geringer Menge in Leber und Darm. Eine hohe Expression hingegen liegt in den Nebennieren, den Nieren, der Bauchspeicheldrüse, der Plazenta, der Milz, den Lungen, den Ovarien, den Hoden, dem Gehirn, den peripheren Nerven und dem Liquor vor (Rassart et al., 2000). Des Weiteren ist ApoD der Hauptbestandteil der Zystenflüssigkeit bei Frauen mit Makrozysten der Brust (Balbin et al., 1990). Es ist zudem in den Epithelzellen der Prostata, im Kammerwasser produziert durch den Ziliarkörper des

Auges und im Sekret der apokrinen Achseldrüsen zu finden (Aspinall et al., 1995, Escribano et al., 1995, Zeng et al., 1996). In all diesen Geweben wird es primär durch Fibroblasten, vor allem den Fibroblasten in unmittelbarer Nähe der Blutgefäße bzw. den Gliazellen des ZNS, insbesondere Astrozyten und Oligodendrozyten sowie durch die endoneuronalen Fibroblasten des peripheren Nervensystems (PNS) gebildet (Sutcliffe und Thomas, 2002). Es kann sezerniert werden und durch Endozytose in Zellen aufgenommen werden (Sanchez und Ganfornina, 2021).

Seine Funktion ebenso wie seine Liganden sind bis heute noch nicht endgültig identifiziert worden. Es ist aber davon auszugehen, dass es sich um ein multifunktionales Protein handelt, das eine Gruppe verschiedener Liganden bindet. Dabei variieren die Liganden möglicherweise abhängig vom Gewebe. Seine Funktion wird nach der Hypothese von Provost et al. am ehesten lokal und nicht systemisch ausgeübt (Provost et al., 1990).

Zudem scheint ApoD mit seinen hydrophoben Strukturen im Bereich des Liganden-Bindungstascheneingangs an Lipidstrukturen binden zu können, ohne eine Protein-Protein-Interaktion hierfür zu benötigen (Sanchez und Ganfornina, 2021).

4.6 Kritische Bewertung und Ausblick

Obwohl die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit bereits längere Zeit zurückliegen und heutzutage teilweise andere technische Verfahren wie der 3D-Druck Anwendung finden würden, hat die Arbeit weiterhin Relevanz. Führt man eine Pubmed-Suche mit den Begriffen genital dermal skin model, genital skin model, three-dimensional skin model und genital skin tissue engineering durch, zeigt sich, dass sie bis heute die einzige Arbeit ist, in der ein humanes genitales Dermismodell entwickelt und das Zellverhalten in dieser dreidimensionalen Matrix vergleichend untersucht wurde. Zwar gibt es spannende Entwicklungen und Innovationen im Bereich des Tissue Engineering, diese legen ihren Schwerpunkt aber auf andere Hautareale oder im Bereich des Urogenitaltrakts auf die Entwicklung artifizierlicher Urethramodelle. Die Genitalhaut bleibt hierbei ausgespart.

Bei kritischer Betrachtung der Arbeit zeigen sich jedoch einige limitierende Faktoren und Optimierungsmöglichkeiten. Zunächst sollten zum Erreichen einer höheren Zelldichte in der Integra[®]-Matrix die Kulturbedingungen optimiert werden. Hierzu gehört insbesondere die Verbesserung der Nährstoffversorgung und des Abtransports von Abbauprodukten. Es wäre

denkbar eine Versuchsanordnung zu konstruieren, durch die die Integra®-Matrix mit einem stetig durchfließenden Zellkulturmedium versorgt würde.

Um das aktuelle Dermismodell zu einem probaten therapeutisch einsetzbaren Genitalhautersatz zu machen, bedarf es neben der Steigerung der Zelldichte in der Integra®-Matrix weiterer Entwicklungen. Hier ist insbesondere die Entwicklung eines zweischichtigen Modells mit einer oberen Keratinozyten- oder Urothelschicht zu nennen. Auf diese Weise würde es sich um einen vollständigen Hautersatz handeln, der auch seiner Barrierefunktion nachkommen könnte. Langfristig wäre die Entwicklung eines mehrschichtigen vaskularisierten Modells wünschenswert. Vor einer therapeutischen Nutzung müssten dann noch umfangreiche Untersuchungen zur Anwendbarkeit und Risikobewertung gegebenenfalls auch im Tierversuch erfolgen. Perspektivisch könnte so aber ein individueller Hautersatz durch Nutzung patienteneigener Fibroblasten und Keratinozyten entwickelt werden. Auch hier bietet der 3D-Druck aussichtsreiche Perspektiven.

Bei der Charakterisierung des Dermismodells und Anwendung als Versuchseinheit ist eine Limitation die geringe Probandenzahl der aktuellen Arbeit. Untersuchungen an einem größeren Probandenkollektiv könnten bei dem Vergleich von Monolayer- und Integra®-Matrix-Kulturen Unterschiede in der Expression Androgen-responsiver Gene, die auf die unterschiedlichen Kulturbedingungen zurückzuführen sind, aufzeigen. Zudem könnten möglicherweise weitere Androgen-responsive Gene identifiziert werden. Auch hier stehen heutzutage neue technische Verfahren zur Verfügung. Ein interessante Untersuchungsmethode wäre beispielsweise das ChIP Sequencing (Chromatin ImmunoPrecipitation DNA-Sequencing). Hierbei werden die Bindungsstellen eines DNA-interagierenden Proteins wie dem Androgenrezeptors im gesamten Genom kartiert. Auch die RNA-Sequenzierung stellt eine Möglichkeit dar Androgen-responsive Gene zu identifizieren, da mit dieser Methode die mRNA-Konzentration und damit die Genexpression unter verschiedenen Bedingungen gemessen und dann miteinander verglichen werden kann.

Passend zu anderen Arbeiten ergaben die Untersuchungen dieser Arbeit Hinweise darauf, dass es sich bei Apolipoprotein D um ein potenzielles Androgen-responsives Gen handeln könnte. Signifikante Unterschiede in der Genexpression konnten jedoch nicht gezeigt werden. Dies mag auch an der kleinen Probandenzahl gelegen haben, so dass auch hier

eine Überprüfung der Ergebnisse an einem größeren Probandenkollektiv sinnvoll wäre. Zudem könnte der Vergleich der Genexpression von Genitalhautfibroblasten von CAIS-Patienten und gesunden Probanden, die von Beginn der Zellkultur an mit DHT-Zusatz kultiviert wurden, weitere Aufschlüsse bringen. Ähnliche Untersuchungen hatten bisher zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt, wobei die Möglichkeit, dass es in den vorangegangenen Studien zu einer Abschaltung der Androgenwirkung aufgrund des initialen Androgenentzugs kam, denkbar wäre und durch eine solche Untersuchung ausgeschlossen werden könnte. Zum anderen könnte es aber auch die Möglichkeit bieten die Genexpression der Androgen-responsiven Gene zu messen und somit Hinweise auf das Ausmaß der Funktionseinschränkung des Androgenrezeptors erkrankter Patienten zu erhalten und gegebenenfalls Rückschlüsse auf den Phänotyp zu ziehen.

5 Zusammenfassung

In unterschiedlichen Bereichen besteht ein Interesse an der Entwicklung eines Genitalhautersatzes. Dieser könnte in der rekonstruktiven Chirurgie zur Therapie von Verletzungen, in der Fehlbildungschirurgie und bei geschlechtsangleichenden Operationen zum Einsatz kommen. Zudem besteht in der Industrie sowie in der Grundlagenforschung der Bedarf an neuen experimentellen Systemen, die den In-vivo-Zustand detailgetreuer abbilden. Artificielle Genitalhautmodelle könnten hier zur Testung von Medikamenten und Kosmetika sowie in der DSD (Disorder/ Difference of Sex Development) - Forschung als Versuchseinheit genutzt werden. Mit dem Ziel ein genitales Dermismodell zu entwickeln, wurde eine dreidimensionale Matrixzellkultur hergestellt und diese mit den etablierten Monolayerkulturen verglichen. Eine erste Anwendung im Bereich der DSD-Forschung mit dem Ziel potenzielle Androgen-responsive Gene nachzuweisen, erfolgte im Anschluss. Hierfür wurden vergleichende Untersuchungen der Genexpression von Vorhautfibroblasten, die mit und ohne Dihydrotestosteron-Zusatz angezüchtet wurden, durchgeführt.

Bei der Entwicklung des Dermismodells wurde Integra[®], ein in der Verbrennungsmedizin eingesetztes synthetisches Membransystem, als Gerüststruktur genutzt und erfolgreich mit Vorhautfibroblasten gesunder Probanden besiedelt. Die vergleichenden Untersuchungen zwischen Integra[®]-Matrix- und Monolayerkulturen in Bezug auf die Expression des Androgenrezeptors, seines Gens sowie zweier potenzieller Androgen-responsiver Gene zeigten bis auf eine gesteigerte Expression des potenziellen Androgen-responsiven Gens Apolipoprotein D in der Integra[®]-Matrix-Kultur keine signifikanten Unterschiede. Vergleichende cDNA-Microarray-Voruntersuchungen der Genexpression von Vorhautfibroblasten, die mit und ohne Dihydrotestosteron-Zusatz angezüchtet wurden, hatten zwei Anwärter als potenziell Androgen-responsive Gene identifiziert, Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) und Apolipoprotein D. Die weiterführenden Untersuchungen mittels Real-Time-PCR am größeren Probandenkollektiv dieser Arbeit konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Expression der beiden Gene zeigen. Die Expression von Apolipoprotein D nach DHT-Zusatz war aber im Median erhöht, so dass es weiterhin als potenzielles Androgen-responsives Gen passend zu Studien anderer Arbeitsgruppen wie Appari et al. in Frage kommt.

6 Literaturverzeichnis

Afewerki S, Sheikhi A, Kannan S, Ahadian S, Khademhosseini A: Gelatin-polysaccharide composite scaffolds for 3D cell culture and tissue engineering: Towards natural therapeutics. *Bioeng Transl Med* 4(1): 96-115 (2018)

Ammerpohl O, Bens S, Appari M, Werner R, Korn B, Drop SLS, Verheijen F, van der Zwan Y, Bunch T, Hughes I, Cools M, Riepe FG, Hiort O, Siebert R, Holterhus P-M: Androgen Receptor Function Links Human Sexual Dimorphism to DNA Methylation. *PLoS One* 8: e73288 (2013)

Appari M, Werner R, Wünsch L, Cario G, Demeter J, Hiort O, Riepe F, Brooks JD, Holterhus P-M: Apolipoprotein D (APOD) is a putative biomarker of androgen receptor function in androgen insensitivity syndrome. *J Mol Med* 87: 623-632 (2009)

Arakane F, Kallen CB, Watari H, Stayrook SE, Lewis M, Strauss JF: Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis. *Endocr Res* 24: 463-468 (1998)

Aspinall JO, Bentel JM, Horsfall DJ, Haagensen DE, Marshall VR, Tilley WD: Differential expression of apolipoprotein-D and prostate specific antigen in benign and malignant prostate tissues. *J Urol* 154: 622-628 (1995)

Atala A, Danilevskiy M, Lyundup A, Glybochko P, Butnaru D, Vinarov A, Yoo JJ: the potential role of tissue-engineered urethral substitution: clinical and preclinical studies. *J Tissue Eng Regen Med* (2015)

Ayrault Jarrier M, Levy G, Polonovski J: Study of humanserum alpha-lipoproteins by immunoelectrophoresis. *Bull soc chim biol* 45: 703-713 (1963)

Azar WJ, Zivkovic S, Werther GA, Russo VC: IGFBP-2 nuclear translocation is mediated by a functional NLS sequence and is essential for its pro-tumorigenic actions in cancer cells. *Oncogene* 33: 578-588 (2014)

Balbin M, Freije JMP, Fueyo A, Sanchez LM, Lopez-Otin C: Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease. *Biochem J* 271: 803-807 (1990)

Baxter RC: IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insight. *Nat Rev Cancer* 14: 329-341 (2014)

Bebermeier J-H, Brooks JD, DePrimo SE, Werner R, Deppe U, Demeter J, Hiort O, Holterhus P-M: Cell-line and tissue specific signatures of androgen receptor-coregulator transcription. *J Mol Med* 84: 919-931 (2006)

Benam KH, Dauth S, Hassell B, Herland A, Jain A, Jang KJ, Karalis K, Kim HJ, MacQueen L, Mahmoodian R, Musah S, Torisawa YS, van der Meer AD, Villenave R, Yadid M, Parker KK, Ingber DE: Engineered in vitro disease models. *Annu Rev Pathol* 10: 195-262 (2015)

- Biason-Lauber A, Miller WL, Pandey AV, Flück CE: Of marsupials and men: “Backdoor” dihydrotestosterone synthesis in male sexual differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 371: 124-132 (2013)
- Blais Y, Sugimoto K, Carrière MC, Haagensen DE, Labrie F, Simard J: Potent stimulatory effect of interleukin-1 alpha on apolipoprotein D and gross cystic disease fluid protein-15 expression in human breast-cancer cells. *Int J Cancer* 59: 400-407 (1994)
- Blais Y, Sugimoto K, Carrière MC, Haagensen DE, Labrie F, Simard J: Interleukin-6 inhibits the potent stimulatory action of androgens, glucocorticoids and interleukin-1 alpha on apolipoprotein D and GCDFP-15 expression in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 62: 732-737 (1995)
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME: Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286: 1358-1362 (1999)
- Bott K, Upton Z, Schrobback K, Ehrbar M, Hubbell JA, Lutolf MP, Rizzi SC: The effect of matrix characteristics on fibroblast proliferation in 3D gels. *Biomaterials* 31: 8454-8464 (2010)
- Brinkmann AO, Faber PW, van Rooij HCJ, Kuiper GGJM, Ris C, Klassen P, van der Korput JAGM, Voorhorst MM, van Laar JH, Mulder E, Trapman J: The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *J steroid Biochem* 34: 307-310 (1989)
- Brodie J, McEwan IJ: Intra-domain communication between the N-terminal and DNA-binding domains of the androgen receptor: modulation of androgen response element DNA binding. *J Mol Endocrinol* 34: 603-615 (2005)
- Brown CJ, Goss SJ, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS, Willard HF: Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of an DNA polymorphism. *Am J Hum Genet* 44: 264-269 (1989)
- Brown TR, Migeon CJ: Cultured human skin fibroblasts: a model for the study of androgen action. *Mol Cell Biochem* 36: 3-22 (1981)
- Chamberlain NL, Whitacre DC, Miesfeld RL: Delineation of two distinct type 1 activation functions in the androgen receptor amino-terminal domain. *J Biol Chem* 271: 26772-26778 (1996)
- Chang DK, Louis MR, Gimenez A, Reece EM: The Basics of Integra Dermal Regeneration Template and its Expanding Clinical Applications. *Semin Plast Surg* 33: 185-189 (2019)
- Chaturvedi AP, Dehm SM: Androgen Receptor Dependence. *Adv Exp Med Biol* 210: 333-350 (2019)
- Chen KL, Wu HC, Chang CH: Tissue-engineered constructs for urethral regeneration. *Urol Sci* 23: 42-44 (2012)

- Chen L, Xing Q, Zhai Q, Tahtinen M, Zhou F, Chen L, Xu Y, Qi S, Zhao F: Pre-vascularization Enhances Therapeutic Effects of Human Mesenchymal Stem Cell Sheets in Full Thickness Skin Wound Repair. *Theranostics* 7(1): 117-131 (2017)
- Choudhry R, Parker G, Hodgins MB: Cytochemical analysis of androgen receptor regulation in LNCaP cells and genital skin fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 684: 211-213 (1993)
- Claessens F, Denayer S, van Tilborgh N, Kerkhofs S, Helsen C, Haelens A: Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl Recept Signal* 6: 1-13 (2008)
- Clemmons DR: IGF Binding Proteins and their Functions. *Mol Reprod Dev* 35: 368-375 (1993)
- Coffey K, Robson CN: Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. *J Endocrinol* 215: 221-237 (2012)
- Dassati S, Waldner A, Schweigreiter R: Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. *Neurobiol Aging* 35: 1632-42 (2014)
- De Bruyn R, Bollen R, Claessens F: Identification and characterization of androgen response elements. *Methods Mol Biol* 776: 81-93 (2011)
- Degraff DJ, Aguiar AA, Chen Q, Adams LK, Williams BJ, Sikes RA: Androgen mediated translational and postranslational regulation of IGFBP-2 in androgen-sensitive LNCaP human prostate cancer cells. *Am J Transl Res* 2: 200-208 (2010)
- De Kemp V, de Graaf P, Fledderus JO, Ruud Bosch JL, de Kort LM: Tissue engineering for human urethral reconstruction: systematic review of recent literature. *PLoS One* 10(2): e0118653 (2015)
- Delon LC, Guo Z, Oszmiana A, Chien CC, Gibson R, Prestidge C, Thierry B: A systematic investigation of the effect of the fluid shear stress on Caco-2 cells towards the optimization of epithelial organ-on-chip models. *Biomaterials* 225:119521 (2019)
- Diesing D, Elmlinger MW, Schuett BS, Weidemann W, Romalo G, Schweikert HU, Spindler K-D, Ranke MB: Genital Skin Fibroblasts (GF) of Patients with Androgen Insensitivity Syndrome Express Higher Insulin-like Growth Factor Binding Protein (IGFBP) -2, -3 and -5 than GF of Normally virilized Males. *Horm Res* 60: 73-78 (2003)
- Drayna DT, McLean JW, Wion KL, Trent JM, Drabkin HA, Lawn RM: Human Apolipoprotein D Gene: Gene Sequence, Chromosome localization, and Homology to the α 2u-Globulin superfamily. *DNA* 6: 199-204 (1987)
- Drucker WD: Biologic activity and metabolism of androgenic hormones: the role of the adrenal androgens. *Bull N Y Acad Med* 53: 347-358 (1977)

Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z: Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* 32: 266-277 (2017)

Eichinger A, Nasreen A, Kim HJ, Skerra A: Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of Apolipoprotein D. *J Biol Chem* 282: 31068-31075 (2007)

Elmlinger MW, Mayer I, Schnabel D, Schuett BS, Diesing D, Romalo G, Wollmann HA, Weidemann W, Spindler K-D, Ranke MB, Schweikert HU: Decreased expression of IGF-II and its binding protein, IGF-binding protein-2, in genital skin fibroblasts of patients with complete androgen insensitivity syndrome compared with normally virilized males. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4741-4746 (2001)

Escribano J, Ortego J, Coca-Prados M: Isolation and characterization of cell-specific cDNA clones from a subtractive library of the ocular ciliary body of a single normal human donor: Transcription and synthesis of plasma proteins. *J Biochem* 118: 921-931 (1995)

Estébanez-Perpiná E, Arnold AA, Nguyen P, Delgado Rodrigues E, Mar E, Bateman R, Pallai P, Shokat KM, Baxter JD, Kiplin Guy R, Webb P, Fletterick RJ: A surface on the androgen receptor that allosterically regulates coactivator binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 16074-16079 (2007)

Faber PW, King A, van Rooij HCJ, Brinkmann AO, de Both NJ, Trapman J: The mouse androgen receptor: functional analysis of the protein and characterization of the gene. *Biochem J* 278: 269-278 (1991)

Feng C, Xu YM, Fu Q, Zhu WD, Cui L: Reconstruction of three-dimensional neourethra using lingual keratinocytes and corporal smooth muscle cells seeded acellular corporal spongiosum. *Tissue Eng Part A* 17(23-24): 3011-3019 (2011)

Flück CE, Pandey AV: Steroidgenesis of the testis – new genes and pathways. *Ann Endocrinol* 75: 40-47 (2014)

Foradori CD, Weiser MJ, Handa RJ: Non-genomic actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* 29: 169-181 (2008)

Furutani T, Watanabe T, Tanimoto K, Hashimoto T, Koutoku H, Kudoh M, Shimizu Y, Kato S, Shikama H: Stabilization of androgen receptor protein is induced by agonist, not by antagonists. *Biochem Biophys Res Commun.* 294: 779-784 (2002)

Gad YZ, Berkovitz GD, Migeon CJ, Brown TR: Studies of up-regulation of androgen receptors in genital skin fibroblasts. *Mol Cell Endocrinol* 57: 205-213 (1988)

Griffith LG, Swartz MA: Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 211-224 (2006)

Gulia C, Baldassarra S, Zangari A, Briganti V, Gigli S, Gaffi M, Signore F, Vallone C, Nucciotti R, Constantini FM, Pizzuti A, Bernardo S, Porrello A, Piergentili R: Androgen insensitivity syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22: 3873-3887 (2018)

Haelens A, Verrijdt G, Callewaert L, Christiaens V, Schauwaers K, Peeters B, Rombauts W, Claessens F: DNA recognition by the androgen receptor: evidence for an alternative DNA-dependent dimerization, and an active role of sequences flanking the response element on transactivation. *Biochem J* 369: 141-151 (2003)

He B, Wilson EM: The NH₂-terminal and carboxyl-terminal interaction in the human androgen receptor. *Mol Genet Metab* 75: 293-298 (2002)

Heemers HV, Tindall DJ: Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* 28: 778-808 (2007)

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-994 (1996)

Hoeflich A, Russo VC: Physiology and pathophysiology of IGFBP-1 and IGFBP-2 - consensus and dissent on metabolic control and malignant potential. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 29: 685-700 (2015)

Hoeflich A, Wirthgen E, David R, Classen CF, Spitschak M, Brenmoehl J: Control of IGFBP-2 expression by steroids and peptide hormones in vertebrates. *Front Endocrinol* 5 (2014)

Holterhus P-M, Hiort O, Demeter J, Brown PO, Brooks JD: Differential gene-expression patterns in genital fibroblasts of normal males and 46, XY females with androgen insensitivity syndrome: evidence for early programming involving the androgen receptor. *Genome Biol* 4: R37 (2003)

Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach AD: Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med* 9(3): 592-608 (2005)

Hornig NC, Ukat M, Schweikert HU, Hiort O, Werner R, Drop SL, Cools M, Hughes IA, Audi L, Ahmed SF, Demiri J, Rodens P, Worch L, Wehner G, Kulle AE, Dunstheimer D, Müller-Roßberg E, Reinehr T, Hadidi AT, Eckstein AK, van der Horst C, Seif C, Siebert R, Ammerpohl O, Holterhus PM: Identification of an AR Mutation-Negative Class of Androgen Insensitivity by Determining Endogenous AR Activity. *J Clin Endocrinol Metab* 101: 4468-4477 (2016)

Hughes IA, Davies JD, Bunch TI, Pasterski V, Mastroyannopoulou K, MacDougall J: Androgen insensitivity syndrome. *Lancet* 380: 1419-1428 (2012)

Hume R, Kelly RW, Taylor PL, Boyd GS: The catalytic cycle of cytochrome p-450_{sc} and intermediates in the conversion of cholesterol to pregnenolone. *Eur J Biochem* 140: 583-591 (1984)

Hynes RO: Integrins: A Family of Cell Surface Receptors. *Cell* 48: 549-554 (1987)

Imperato-McGinley J, Zhu Y-S: Androgens and male physiology the syndrome of 5 α -reductase-2 deficiency. *Mol Cell Endocrinol* 198: 51-59 (2002)

Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci.* 7: 33 (2020)

Jenster G, Trapman J, Brinkmann AO: Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochem J* 293: 761-768 (1993)

Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, Ng L, Simpson DM, Rosenfeld RG: Insulin-like Growth Factor-binding Proteins (IGFBPs) and Their Regulatory Dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 619-637 (1996)

Khademhosseini A, Langer R: A decade of progress in tissue engineering. *Nat Protoc* 11(10): 1775-1781 (2016)

Kim BS, Gao G, Kim JY, Cho DW: 3D Cell Printing of Perfusable Vascularized Human Skin Equivalent Composed of Epidermis, Dermis, and Hypodermis for Better Structural Recapitulation of Native Skin. *Adv Healthc Mater* 8(7): e1801019 (2019)

Knerr J, Werner R, Schwan C, Wang H, Gebhardt P, Grötsch H, Caliebe A, Spielmann M, Holterhus PM, Grosse R, Hornig NC: Formin-mediated nuclear actin at androgen receptors promotes transcription. *Nature* 617: 616-622 (2023)

Kraemer FB, Shen W-J, Harada K, Patel S, Osuga J-I, Ishibashi S, Azhar S: Hormone-sensitive lipase is required for high-density lipoprotein cholesteryl ester-supported adrenal steroidogenesis. *Mol Endocrinol* 18: 549-557 (2004)

Kremer M, Berger A: Perspektiven des künstlichen Hautersatzes. Vom biologischen Verband zur künstlichen Haut. *Dt Ärztebl* 97 [Heft 18]: A-1222–1227 (2000)

Lambert J, Provost PR, Marcel YL, Rassart E: Structure of the human Apolipoprotein D Gene promoter region. *Biochim Biophys* 1172: 190-192 (1993)

Lamson G, Giudice LC, Rosenfeld RG: Insulin-like Growth Factor Binding Proteins: Structural and Molecular Relationships. *Growth Factors* 5: 19-28 (1991)

Lancaster MA, Huch M: Disease modelling in human organoids. *Dis Model Mech* 12(7): dmm039347 (2019)

Leung JK, Sadar MD: Non-genomic Actions of the Androgen receptor in Prostate Cancer. *Front Endocrinol* 8: 2 (2017)

Li D, Zhou W, Pang J, Tang Q, Zhong B, Shen C, Xiao L, Hou T: A magic drug target: Androgen receptor. *Med Res Rev* 39: 1485-1514 (2019)

Li H, Ruberu K, Karl T, Garner B: Cerebral Apolipoprotein-D Is Hypoglycosylated Compared to Peripheral Tissues and Is Variably Expressed in Mouse and Human Brain Regions. *PLoS One* 11: e0148238 (2016)

Li T, Forbes ME, Fuller GN, Li J, Yang X, Zhang W: IGFBP2: integrative hub of developmental and oncogenic signaling network. *Oncogene* 39: 2243-2257 (2020)

Lopez-Boado Y, Tolivia J, Lopez-Otin C: Apolipoprotein D Gene Induction by Retinoic Acid is Concomitant with Growth arrest and cell differentiation in Human Breast cancer cells. *J Biol Chem* 269: 26871-26878 (1994)

Lucas-Herald A, Bertelloni S, Juul A, Bryce J, Jiang J, Rodie M, Sinnott R, Boroujerdi M, Lindhardt Johansen M, Hiort O, Holterhus PM, Cools M, Guaragna-Filho G, Guerra-Junior G, Weintrob N, Hannema S, Drop S, Guran T, Darendeliler F, Nordenstrom A, Hughes IA, Acerini C, Tadokoro-Cuccaro R, Ahmed SF: The Long-Term Outcome of Boys With Partial Androgen Insensitivity Syndrome and a Mutation in the Androgen Receptor Gene. *J Clin Endocrinol Metab* 101: 3959-3967 (2016)

Lüllmann-Rauch R: *Histologie*, 1. Auflage, Stuttgart, Thieme: 446-453 (2003)

Machens H-G, Berger AC, Mailaender P: Bioartificial skin. *Cells Tissues Organs* 167: 88-94 (2000)

MacNeil S: Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* 445(7130): 874-880 (2007)

Mark S, Kübler B, Höning S, Oesterreicher S, John H, Braulke T, Forssmann W-G, Ständker L: Diversity of human Insulin-like Growth Factor (IGF) Binding Protein-2 Fragments in Plasma: Primary Structure, IGF-Binding Properties, and Disulfide Bonding Pattern. *Biochemistry* 44: 3644-3652 (2005)

Matias PM, Donner P, Coelho R, Thomaz M, Peixoto C, Macedo S, Otto N, Joschko S, Scholz P, Wegg A, Bäsler S, Schäfer M, Egner U, Carrondo MA: Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor: implications for pathogenic gene mutations. *J Biol Chem* 275: 26164-26171 (2000)

McConathy WJ, Alaupovic P: Isolation and partial characterization of Apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Lett* 37: 178-182 (1973)

McConathy WJ, Alaupovic P: Studies on the isolation and partial characterization of Apolipoprotein D and Lipoprotein D of human plasma. *Biochemistry* 15: 515-520 (1976)

McEwan IJ, Gustaffson J-A: Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIF. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8485-8490 (1997)

McEwan IJ: Intrinsic disorder in the androgen receptor: identification, characterisation and drugability. *Mol Biosyst* 8:82-90 (2012)

Mihic A, Li J, Miyagi Y, Gagliardi M, Li SH, Zu J, Weisel RD, Keller G, Li RK: The effect of cyclic stretch on maturation and 3D tissue formation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Biomaterials* 35(9): 2798-2808 (2014)

Miller WL, Auchus RJ: The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 32: 81-151 (2011)

Mirastschijski U, Jiang D, Rinkevich Y, Karim R, Sorg H: Wound repair and scarring of genital skin. *Plast Aesthet Res* 7: 70 (2020)

- Monfort A, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Izeta A: Production of human tissue-engineered skin trilayer on a plasma-based hypodermis. *J Tissue Eng Regen Med* 7(6): 479-490 (2013)
- Moniz T, Costa Lima SA, Reis S: Human skin models: From healthy to disease-mimetic systems; characteristics and applications. *Br J Pharmacol* 177: 4314-4329 (2020)
- Moysidou CM, Barberio C, Owens RM: Advances in Engineering Human Tissue Models. *Front Bioeng Biotechnol.* 8: 620962 (2021)
- Murphy SV, Atala A: 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol* 32(8): 773-785 (2014)
- Naamneh Elzenaty R, du Toit T, Flück CE: Basics of androgen synthesis and action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 36: 101665 (2022)
- Najyb O, Brissette L, Rassart E: Apolipoprotein D Internalization Is a Basigin-dependent Mechanism. *J Biol Chem* 290: 16077-16087 (2015)
- Ng K, Lau, WM: Skin deep: The basics of human skin structure and drug penetration. In N. Dragicevic und H. I. Maibach (Eds.), *Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement: Drug manipulation strategies and vehicle effects*, Berlin Heidelberg: Springer: 3-11 (2015)
- Nikolova MP, Chavali MS: Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioact Mater* 4: 271-292 (2019)
- Palma MM, Fernandez M, Vivanco X, Pino AM: Modulation of androgen receptor protein by culture conditions of human skin fibroblasts. *Int J Androl* 25: 288-294 (2002)
- Park KD, Kwon IK, Kim YH: Tissue engineering of urinary organs. *Yonsei Med J* 41: 780-788 (2000)
- Park SY, Kim Y-J, Gao AC, Mohler JL, Onate SA, Hidalgo AA, Ip C, Park E-M, Yoon SY, Park Y-M: Hypoxia increases androgen receptor activity in prostate cancer cells. *Cancer Res* 66: 5121-5129 (2006)
- Patrão MTCC, Silva EJR, Avellar MCW: Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. *Arq Bras Endocrinol Metab* 53: 934-945 (2009)
- Payne AH, Youngblood GI: Regulation of expression of steroidogenic enzymes in leydig cells. *Biol Reprod* 52: 217-225 (1995)
- Payne AH, Hales DB: Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 25: 947-970 (2004)
- Pereira JJ, Meyer T, Docherty SE, Reid HH, Marshall J, Thompson EW, Rossjohn J, Price JT: Bimolecular interaction of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 with

alphavbeta3 negatively modulates IGF-I-mediated migration and tumor growth. *Cancer Res*: 64: 977-984. (2004)

Provost PR, Weech PK, Tremblay NM, Marcel YL, Rassart E: Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit Apolipoprotein D. *J Lipid Res* 31: 2057-2065 (1990)

Purdue GF: Dermagraft-TC Pivotal Efficacy and Safety Study. *J Burn Care Rehabil* 18: 13-14 (1997)

Quigley CA, DeBellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS: Androgen receptor defects: Historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16: 271-321 (1995)

Rashidbenam Z, Jasman MH, Hafez P, Tan GH, Goh EH, Fam XI, Ho CCK, Zainuddin ZM, Rajan R, Nor FM, Shuhaili MA, Kosai NR, Imran FH, Ng MH: Overview of Urethral Reconstruction by Tissue Engineering: Current Strategies, Clinical Status and Future Direction. *Tissue Eng Regen Med*. 16: 365-384 (2019)

Rassart E, Bedirian A, Do Carmo S, Guinard O, Sirois J, Terrisse L, Milne R: Apolipoprotein D. *Biochim Biophys* 1482: 185-198 (2000)

Rassart E, Desmarais F, Najyb O, Bergeron K-F, Mounier C: Apolipoprotein D. *Gene* 756: 144874 (2020)

Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, Lopez-Bayghen E, Soker S, Atala A: Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet* 377(9772): 1175-1182 (2011)

Rheins LA, Edwards SM, Miao O, Donnelly TA: Skin2TM: an in vitro model to assess cutaneous immunotoxicity. *Toxic in vitro* 8: 1007-1014 (1994)

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L: Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual* (2013)

Sanchez D, Ganfornina MD. The Lipocalin Apolipoprotein D Functional Portrait: A Systematic Review. *Front Physiol* 12: 738991 (2021)

Schiffer L, Arlt W, Storbeck K-H: Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited. *Mol Cell Endocrinol* 465: 4-26 (2018)

Scott HM, Mason JI, Sharpe RM: Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr Rev* 30: 883-925 (2009)

Shaffer PL, Jivan A, Dollins DE, Claessens F, Gewirth DT: Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4758-4763 (2004)

Shevchenko RV, James SL, James SE: A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface* 7(43): 229-258 (2010)

- Shimasaki S, Ling N: Identification and Molecular Characterization of Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Progr Growth Factor Res* 3: 243-266 (1991)
- Sieh S, Taubenberger AV, Rizzi SC, Sadowski M, Lehman ML, Rockstroh A, An J, Clements JA, Nelson CC, Hutmacher DW: Phenotypic characterization of prostate cancer LNCaP cells cultured within a bioengineered microenvironment. *Plos One* 7 (2012)
- Simard J, Dauvois S, Haagensen DE, Lévesque C, Mérand Y, Labrie F: Regulation of progesterone-binding breast cyst protein GCDFP-24 secretion by estrogens and androgens in human breast cancer cells: a new marker of steroid action in breast cancer. *Endocrinology* 126: 3223-3231 (1990)
- Simard J, de Launoit Y, Haagensen DE, Labrie F: Additive stimulatory action of glucocorticoids and androgens on basal and estrogen-repressed apolipoprotein-D messenger ribonucleic acid levels and secretion in human breast cancer cells. *Endocrinology* 130: 1115-1121 (1992)
- Simard J, Veilleux R, de Launoit Y, Haagensen DE, Labrie F: Stimulation of Apolipoprotein D Secretion by Steroids Coincides with Inhibition of Cell Proliferation in Human LNCaP Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 51: 4336-4341 (1991)
- Simental JA, Sar M, Lane MV, French FS, Wilson EM: Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 266: 510-518 (1991)
- Sircili MHP, de Queiroz e Silva FA, Costa EMF, Brito VN, Arnhold IJP, Dénes FT, Inacio M, Bilharinho de Mendonca B: Long-Term Surgical Outcome of Masculinizing Genitoplasty in Large Cohort of Patients With Disorders of Sex Development. *J Urol* 184: 1122-1127 (2010)
- Sitarski AM, Fairfield H, Falank C, Reagan MR: 3d Tissue Engineered In Vitro Models Of Cancer In Bone. *ACS Biomater Sci Eng* 4(2): 324-336 (2018)
- Stern R, McPherson M, Longaker MT: Histologic study of artificial skin used in the treatment of full-thickness thermal injury. *J Burn Care Rehabil* 11: 7-13 (1990)
- Sutcliffe JG, Thomas EA: The neurobiology of apolipoproteins in psychiatric disorders. *Mol Neurobiol* 26: 369-388 (2002)
- Tanase-Nakao K, Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Hara M, Matsumoto K, Matsubara Y, Igarashi M, Miyado M, Fukami M: Dihydrotestosterone induces minor transcriptional alterations in genital skin fibroblasts of children with and without androgen insensitivity. *Endocr J* 66: 387-393 (2019)
- Taubenberger AV, Bray LJ, Haller B, Shaposhnykov A, Binner M, Freudenberg U, Guck J, Werner C: 3D extracellular matrix interactions modulate tumour cell growth, invasion and angiogenesis in engineered tumour microenvironments. *Acta Biomater* 36: 73-85 (2016)
- Udhane SS, Flück CE: Regulation of human (adrenal) androgen biosynthesis - New insights from novel throughput technology studies. *Biochem Pharmacol* 102: 20-33 (2016)

- Vig K, Chaudhari A, Tripathi S, Dixit S, Sahu R, Pillai S, Dennis VA, Singh SR: Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* 18(4): 789 (2017)
- Weng T, Zhang W, Xia Y, Wu P, Yang M, Jin R, Xia S, Wang J, You C, Han C, Wang X: 3D bioprinting for skin tissue engineering: Current status and perspectives. *J Tissue Eng* 12: 1-28 (2021)
- Werner R, Holterhus P-M: Androgen Action. *Endocr Dev* 27: 28-40 (2014)
- Wood TL, Brown AL, Rechler MM, Pintar JE: The Expression Pattern of an Insulin-Like Growth Factor (IGF)-Binding Protein Gene Is Distinct from IGF-II in the Midgestational Rat Embryo. *Mol Endocrinol* 4: 1257-1263 (1990)
- Yan WC, Davoodi P, Vijayavenkataraman S, Tian Y, Ng WC, Fuh JYH, Robinson KS, Wang CH: 3D bioprinting of skin tissue: From pre-processing to final product evaluation. *Adv Drug Deliv Rev* 132: 270-295 (2018)
- Yang C-Y, Gu Z-W, Blanco-Vaca F, Gaskell SJ, Yang M, Massey JB, Gotto, Jr. AM, Pownall HJ: Structure of human Apolipoprotein D: Locations of the intermolecular and the intramolecular disulfide links. *Biochemistry* 33: 12451-12455 (1994)
- Yu H, Rohan T: Role of Insulin-like Growth factor family in Cancer Development and Progression. *J Natl Cancer Inst* 92: 1472-1489 (2000)
- Yu JR, Navarro J, Coburn JC, Mahadik B, Molnar J, Holmes JH 4th, Nam AJ, Fisher JP: Current and Future Perspectives on Skin Tissue Engineering: Key Features of Biomedical Research, Translational Assessment, and Clinical Application. *Adv Healthc Mater* 8(5): e1801471 (2019)
- Zamagni A, Cortesi M, Zanoni M, Tesei A: Non-nuclear AR Signaling in Prostate Cancer. *Front Chem* 7: 651 (2019)
- Zarif JC, Lamb LE, Schulz VV, Nollet EA, Miranti CK: Androgen receptor non-nuclear regulation of prostate cancer cell invasion mediated by Src and matriptase. *Oncotarget* 6: 6862-6876 (2015)
- Zeng C, Spielman AI, Vowels BR, Leyden JJ, Biemann K, Preti G: A human axillary odorant is carried by Apolipoprotein D. *Proc Natl Acad* 93: 6626-6630 (1996)
- Zhang J, Xiang J-Q, Zhang Y-W, Chen Y-Y, Zhou X-Y, Liu Y, Li S: Cell adhesion regulates expression of the androgen receptor and coregulators in different prostate cancer cells. *Int J Mol Sci* 8: 156-165 (2007)

7 Anhänge

7.1 Material

7.1.1 Geräte

Wasserbad	Münstermann + Scheel, Lübeck
Zellkulturbank	Heraeus, Hanau
Brutschrank Typ BB6220	Heraeus, Hanau
Universal 16 A Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Eppendorf Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Nalgene-Cryo-Einfriergerät	Nunc Thermo Fisher Scientific, Wiesbaden
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Schlittenmikrotom	Leica, Solms
Objekträger-Eindeckautomat	Medite GmbH, Burgdorf
Multi Gourmet Dampfgarer	Braun, Kronberg
Stainer „Tech Mate“ 500 Plus	Dako, Glostrup, Dänemark
Schüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
MS2 Minishaker	Hassa, Lübeck
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Rührer MR3000	Heidolph, Schwabach
Mini-PROTEAN®-3-Cell	BioRad, Feldkirchen
Mini-Trans-Blot®-Electrophoretic-Transfer-Cell	BioRad, Feldkirchen
Molecular-Imager-Chemidoc-XRS	BioRad, Feldkirchen
Vortexer RS2, Typ VM2	IDL, Nidderau
FluoStar OPTIMA	BMG Labtech, Ortenberg

Thermocycler PTC 200	MJ Research, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Olendorf
Light Cycler 2	Roche Diagnostic, Mannheim
Gelkammer- und schlitten	Whatman Biometra, Göttingen
Agarosegelelektrophoresekammer	Whatman Biometra, Göttingen
UV-Kamera	Phase, Lübeck

7.1.2 Software

Quantity One	BioRad, Feldkirchen
Excel	Microsoft, Redmond, USA
Light Cycler Software 3	Roche Diagnostic, Mannheim
Light Cycler Relative Quantification Software	Roche Diagnostic, Mannheim
SPSS-Software	IBM Deutschland, Ehningen

7.1.3 Verbrauchsmaterialien

Petrischale	Greiner, Solingen
Zellkulturflasche mit Filter (25 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflasche mit Filter (75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber 2-Posit. Klinge 25	Sarstedt, Nümbrecht
Chamber Slide	Nunc, Langenselbold
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen-Röhrchen	Harre, Hannover
Cryo Tube	Nunc, Wiesbaden
Biopsie-Stanze	PFM, Köln
Zählkammer nach Neubauer improved	Th. Geyer, Renningen
48-well Platten	Greiner, Solingen
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig

Qiashreddersäule	Qiagen, Hilden
Einmalskalpell	Braun, Melsungen
Eppendorfgefäß	Eppendorf, Hamburg
Nitrozellulosemembran	BioRad, Feldkirchen
Hyperfilm	Amersham, Buckinghamshire, UK
Light Cycler Kapillare	Roche Diagnostic, Mannheim

7.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Zellkultur:

Quantum Nährmedium	Fa. Biotechnologies, Heidelberg
Chang D Medium	Trinova Biochem, Gießen
Antibiotic-Antimycotic Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aktivkohle	Serva, Heidelberg
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dextran T300	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dihydrotestosteron	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Integra®-Matrix	Integra Life Sciences Corporation, Plainsboro, USA
Trypanblau	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Wachstumsversuche:	
MTT	Sigma-Aldrich, Steinheim

Immunhistologie:

Xylol	Klinikapotheke der Universität Lübeck
Ethanol	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Aceton	Merck, Darmstadt
Epitope Retrieval Solution pH 9	Novocastra, Leica Biosystems, Wetzlar
Hämatoxylin	Klinikapotheke der Universität Lübeck
Liquid Fast Red Substrate	Lab Vision, Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA
ChemMate Antibody Diluent	Dako, Glostrup, Dänemark
Neo-Mount	Merck, Darmstadt

Proteinanalyse:

Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Deoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka, Buchs, Schweiz
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Bacitracin	Carl Roth, Karlsruhe
Protein Assay	BioRad, Feldkirchen
Bovine Serum Albumine (BSA)	Serva, Heidelberg
Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards	BioRad, Feldkirchen
Acrylamid (Rotiphoresegel 30)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker B.V., USA
Skim Milk Powder	Difco, Becton & Dickinson, Franklin Lakes, USA
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
RNA-Analyse:	
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat-H ₂ O (DEPC-H ₂ O)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Real-Time-PCR:	
d-ATP	Amersham, Buckinghamshire, UK
d-CTP	Amersham, Buckinghamshire, UK
d-GTP	Amersham, Buckinghamshire, UK
d-TTP	Amersham, Buckinghamshire, UK
Protector RNase-Inhibitor	Roche Diagnostic, Mannheim
FastStart Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostic, Mannheim
UniversalProbeLibrary(UPL)-Sonde	Roche Diagnostic, Mannheim
Universal Reference RNA	Stratagene, La Jolla, USA
Agarose	Pharmacia CKB, Uppsala, Schweden
Borsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA Ladder für Agarosegele (100 bp)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml)	Carl Roth, Karlsruhe

7.1.5 Kits

UltraVision LP Large Volume Detection System Kit	LAB-Vision, Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Quant-iT RiboGreen Kit	Invitrogen life technologies, Karlsruhe
SuperScript II Reverse Transkriptase Kit	Invitrogen life technologies, Karlsruhe
TaqMan Master	Roche Diagnostic, Mannheim

7.1.6 Antikörper

AR 441	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti AR 39.4.1. (mouse)	Biogenex, Fremont, USA
Anti GAPDH (rabbit)	Abcam, Cambridge, UK
Anti mouse	Amersham, Buckinghamshire, UK
Anti rabbit	Sigma-Aldrich, Steinheim

Verdünnung der Antikörper für die Westernblot-Untersuchung:

Antikörper	Verdünnung
<i>Primärantikörper:</i>	
Anti AR Biogenex 39.4.1. (mouse)	1:600
Anti GAPDH Abcam 9485 (rabbit)	1:1000
<i>Sekundärantikörper:</i>	
ECL™ Anti mouse IgG, HRP conjugated sheep antibody, Amersham	1:2000
Anti rabbit IgG, HRP conjugated goat antibody, Sigma	1:4000

7.1.7 Primer

Random Primer	Invitrogen life technologies, Karlsruhe
Sample Primer	Metabion, International, Martinsried

Gen	Primer (4 pmol/ μ l)	UPL-Sonde + Sondensequenz
IGFBP2	5'-CCA AGA AGC TGC GAC CAC-3' 5'-GGA GTA GAG GTG CTC CAG AGG-3'	1 (GCTCCAGG)
ApoD	5'-CAC CCC AGT TAA CCT CAC AGA-3' 5'-GGT GCC GAT GGC ATA AAC-3'	1 (GCTCCAGG)
Androgenrezeptor	5'-TGT TAT GAA GCA GGG ATG ACT C-3' 5'-GCT TCT GGG TTG TCT CCT CA-3'	11 (GCTGGAAG)
GAPDH	5'-AGC CAC ATC GCT CAG ACA C-3' 5'-GCC CAA TAC GAC CAA ATC C-3'	60 (TGGGGAAG)

7.1.8 Zellen

LnCaP-Zellen

DSMZ, Braunschweig

7.1.9 Selbsthergestellte Reagenzien und Gele

10x PBS-Puffer (pH 7,4):

NaCl	80 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Aqua bidest	1 l

1x PBS-Puffer:

10x PBS-Puffer	100 ml
H ₂ O bidest	900 ml
Tween	1 ml

10x Blotting-Puffer:

Tris	20 g
Glycin	112,5 g
H ₂ O bidest	1 l

1x Blotting-Puffer:

10x Blotting-Puffer	150 ml
Methanol	300 ml
H ₂ O bidest	1050 ml

10x Elektroden-Puffer:

Tris	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H ₂ O bidest	1 l

1x Elektroden-Puffer:

10x Elektroden-Puffer	900 ml
H ₂ O bidest	100 ml

Lysispuffer A:

Triton X-100	1,0 ml
DEO	0,5 g
SDS	0,08 g
Puffer C	100 ml
Bacitracin (50 mM)	1:100 (kurz vor Gebrauch hinzufügen)
PMSF (60 mM)	1:100 (kurz vor Gebrauch hinzufügen)

Puffer C:

Tris	4,85 g/l
EDTA	0,45 g/l
Glycerol	118 ml/l 85 %-iges
DTT	10,0 ml/l (1M DTT)

2x Sample-Puffer nach Laemmli:

Tris	1,21 g
SDS	4,0 g
Glycerol (85 %)	23,6 ml
Bromphenolblau	2 mg
H ₂ O	100 ml
DTT	1 :100 (Zugabe kurz vor Verwendung)

5 % Magermilch:

Skim Milk Pulver	5 g
1x PBS/Tween	100 ml

5x Sammelgel-Puffer:

Tris	7,54 g
SDS	0,5 g
H ₂ O bidest	100 ml

10x TBE-Puffer:

Tris	436 g
Borsäure	223 g
Na ₂ -EDTA	37,2 g
H ₂ O bidest	4 l

1x TBE-Puffer:

10x TBE-Puffer	100 ml
H ₂ O bidest	900 ml

7 %-iges Trenngel:

30 %-ige Acrylamidlösung	3 ml
Trenngel-Puffer (1,875 M Tris, 0,05 % SDS, pH 8,8)	2,7 ml
Aqua bidest.	7,2 ml
TEMED	10 μ l
10 % APS	28,8 μ l

4 %-iges Sammelgel:

30 %-ige Acrylamidlösung	0,71 ml
Sammelgel-Puffer (625 mM Tris, 0,5 % SDS, pH 6,8)	1,1 ml
Aqua bidest.	3,5 ml
TEMED	10 μ l
10 % APS	30 μ l

8 Ethikvotum



Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Herrn
Prof. Dr. med. Hiort
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

im Hause

nachrichtlich:
Herrn Prof. Herting
Direktor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

Ihr Antrag an die Ethik-Kommission vom 09. Mai 2008

Antragsteller: Herr Prof. Hiort / Herr Prof. Herting

Titel: Investigation of the molecular pathogenesis and pathophysiology of Disorders of Sex Development (DSD) - EuroDSD

Sehr geehrter Herr Prof. Hiort,
mit der o.g. Studie habe ich mich befasst.

Die Prüfung bezieht sich auf folgende Unterlagen:

- Ihr Anschreiben vom 09. Mai 2008
- Zustimmendes Votum der Ethik-Kommission der Universität zu Kiel vom 05. März 2008 und
- Patienteninformation und Einverständniserklärung.

Die Ethik-Kommission schließt sich dem o.g. positiven Votum an.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500-4639
Fax: (0451) 500-3026
email:
janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Datum: 28.05.2008

Aktenzeichen: **08-081**
(Immer angeben!)



Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät
Ethik-Kommission

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 180 · 23538 Lübeck

Herrn
PD Dr. med. Lutz Wünsch
Klinik für Kinderchirurgie-

Im Haus

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Stellv. Vorsitzende:
Frau Prof. Dr. med. M. Schrader

Ratzeburger Allee 180
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Dr. Angelika Hüppe
Tel.: +49 451 799 2518
Fax: +49 451 799 2522
angelika.hueppe@uk-sh.de

Aktenzeichen: 08-081
Datum: 08. Oktober 2008

Amendment zum Ethikvotum AZ 08-081

Titel: Investigation of the molecular pathogenesis and pathophysiology of disorders of sex development - EuroDSD

Sehr geehrter Herr Wünsch,

die Aufklärungsmaterialien zur Spende von Vorhautgewebe lagen uns zur Beratung vor. Es bestehen aus ethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und rechtlichen Gesichtspunkten keine Bedenken.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich
Ihre

Prof. Dr. med. M. Schrader
(Stellvertretende Vorsitzende)

9 Danksagungen

Zum Abschluss möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst danke ich Prof. Dr. med. Lutz Wunsch für die Bereitstellung des spannenden Themas und die Betreuung während der Fertigstellung der Arbeit. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. med. Olaf Hiort für die Begleitung der Arbeit und seine Denkanstöße zur Ausarbeitung des schriftlichen Teils. Dr. rer. nat. Ralf Werner danke ich für seine Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils.

Ein großer Dank gilt Christine Marschke, Claudia Havel und Dagmar Struve für die Einarbeitung in die Methoden und ihre Hilfe die Herausforderungen der Laborarbeit zu meistern.

Ich danke zudem Dr. rer. nat. Mahesh Appari und der Arbeitsgruppe des endokrinologischen Labors der Kinderklinik des Universitätsklinikum Schleswig-Holsteins, Campus Kiel für die Durchführung der cDNA-Microarray-Voruntersuchungen.

Des Weiteren danke ich dem Histologischen Labor des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck für die Durchführung der immunhistologischen Färbungen.